Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

54. BAND, 1. HEFT

MIT 124 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 5. APRIL 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. Zellforsch.

Preis DM 52.80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorff*. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorff* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George, W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux, H. Braus, H. Spemann*.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

54. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Seite

KNESE, K.-H., und A.-M. KNOOP, Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Zellen in der Eröffnungszone des Epiphysenknorpels. Mit 30 Textabbildungen 1

OHMI, S., Electron microscopic study on Wallerian degeneration of the peripheral nerve. With 37 Figures in the Text 39

HORSTMANN, E., Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Spermiohistogenese beim Menschen. Mit 19 Textabbildungen 68

OLSSON, R., The skin of amphioxus. With 11 Figures in the Text 90

FERNER, H., und I. MÜLLER, Die Bildung der Kopfkappe (Akrosom) bei der Spermienentwicklung des Mauswiesels (*Mustela nivalis* L.). Mit 11 Textabbildungen 105

WARTENBERG, H., und W. SCHMIDT, Elektronenmikroskopische Untersuchungen der strukturellen Veränderungen im Rindenbereich des Amphibieneies im Ovar und nach der Befruchtung. Mit 16 Textabbildungen 118

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 54, 1—38 (1961)

Aus der Elektronenmikroskopischen Abteilung des Anatomischen Institutes der Universität Kiel (Direktor: Prof. Dr. W. Bargmann)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE ZELLEN IN DER ERÖFFNUNGSZONE DES EPIPHYSENKNORPELS

Von

Karl-Heinrich Knese und Anne-Marie Knoop*

Mit 30 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juni 1960)

Einleitung

Das Schicksal der Knorpelzellen nach Eröffnung der Knorpelhöhlen im Ablauf der enchondralen Osteogenese ist bis heute noch recht unklar. Da sich die Zellen im Epiphysenknorpel zu sog. hypertrophen Knorpelzellen umwandeln, wurde vielfach angenommen, daß sie zugrunde gehen. Andere Autoren vermuten eine Entdifferenzierung der Knorpelzellen zu sog. indifferenten Markzellen. Die Knorpelzellen wurden auch als Blutstammzellen angesehen.

Mit den bisherigen Methoden war nur klar zu erkennen, daß die sog. hypertrophen Knorpelzellen am Ende einer Entwicklungsreihe stehen. Nach Anwendung der üblichen Fixierungs- und Färbemethoden erscheinen sie in einem Zustand, der — wie erwähnt — als Ausdruck der Degeneration gedeutet wurde. Die hypertrophen Zellen weisen aber eine starke Toluidinblaumetachromasie auf und enthalten Glykogengranula. Jenseits der Eröffnungszone sind Osteoblasten zu beobachten, deren Gestalt mit derjenigen der hypertrophen Knorpelzellen nicht vergleichbar ist.

Es lag daher nahe, den Bereich zwischen beiden Zellzonen elektronenmikroskopisch genauer zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit schließt sich damit an die vorangegangene über die Bildung des MPS-Protein-Komplexes an, in der die Struktur der Knorpelzellen geschildert wurde (Knese und Knoop 1961). Das fast völlige Versagen der lichtmikroskopischen Routinemethoden im Hinblick auf die Cytologie der Eröffnungszone stellte die Aufgabe, zunächst einmal das elektronenmikroskopische Bild der Zellen in der Eröffnungszone zu beschreiben und zu prüfen, ob sie sichere morphologische Zeichen einer Degeneration oder der Vitalität mit Modifikation der Zellgestalt aufweisen.

Bei unseren histochemischen Untersuchungen wandten wir Methoden zum Nachweis von Polysacchariden, Mucopolysacchariden, Nucleinsäuren und Proteinen mit entsprechenden fermentativen Kontrollen an.

Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen wurden an der Tibia von Rattenfeten, die histochemischen am Metacarpus von Rinderfeten und an der Tibia von Rattenfeten gemacht.

Material und Methode vgl. Knese und Knoop (1961).

* Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Befunde

Im Epiphysenknorpel wird häufig die marknahe Schicht als die der *Zellen des verkalkten Knorpels* von jener der darüberliegenden hypertrophen Knorpelzellen unterschieden (vgl. KNESE und KNOOP 1961). Das elektronenmikroskopi-

Abb. 1. Hypertrophe Knorpelzelle: *1* Membranen des endoplasmatischen Retikulum; *2* Mitochondrien; *3* Reste des Grundplasma; *4* Zellmembranen mit Füßen in Verbindung mit der Interzellularsubstanz; *5* Kalkeinlagerung in enger Verbindung mit der Zellmembran. Vergr. 7200

sche Bild dieser Zellen weicht nicht grundsätzlich von dem der hypertrophen Knorpelzellen (Abb. 1, 2) ab. Infolge geringer Schrumpfung hebt sich das Plasmalemm von der Knorpelkapsel ab. Erhebungen der Zelloberfläche stellen zum Teil wohl abgerissene engere Verbindungen zwischen Zellen und Kapseln dar. Der Zellkörper erscheint leer, d. h. ein Hyaloplasma ist bei Methacrylateinbettung nicht mehr oder nur in Resten in Form kleiner Granula zu erkennen. Weiterhin

sind kürzere oder längere Membranstrecken des endoplasmatischen Retikulum zu beobachten, die annähernd zirkulär um den Kern angeordnet sind. Die Zisternenspalten und Palade-Granula erscheinen recht undeutlich. Unklar ist, ob einzelne vesikuläre Gebilde erweiterte Zisternen oder Gebilde anderer Natur darstellen. Selten treten osmiophile, zackige Lipoideinlagerungen auf. Schließ-

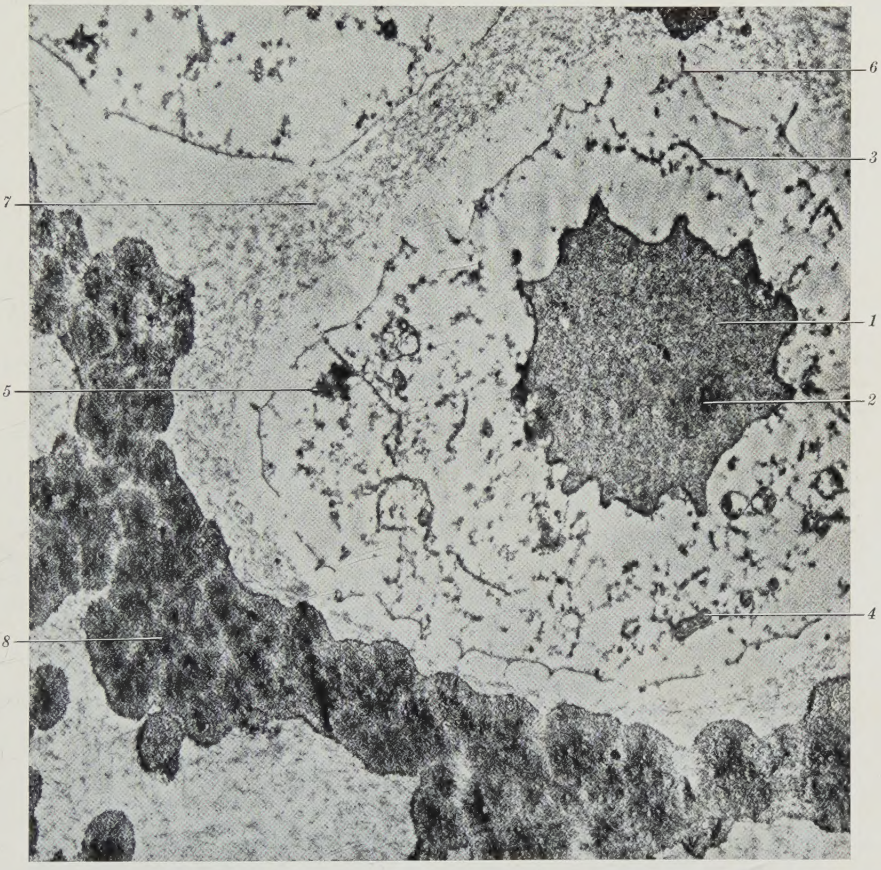


Abb. 2. Zelle aus der Mineralisationszone: *1* Zellkern; *2* Nukleolus; *3* Membranen des endoplasmatischen Retikulum; *4* Mitochondrien; *5* osmiophile Einlagerungen; *6* Zellmembranen mit Füßen; *7* faserige Interzellularsubstanz; *8* Kalkeinlagerung mit scharfer Umgrenzung. Vergr. 5000

lich sind ovoide oder mehr stäbchenförmige Mitochondrien mit Cristae mitochondriales zu finden. Der Kern der Zellen der verkalkten Knorpelschicht, der einen Nucleolus enthält, ist unregelmäßig gelappt, d. h. mit verschieden langen plumpen Ausläufern versehen. Die Kernmembran stellt sich als dunkle Schicht dar. Das Chromatin ist gleichmäßig über den Kernraum verteilt.

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man in der *Interzellularsubstanz* der Mineralisationszone ein Fasernetz (Abb. 2). Die Faserquer- und -schrägschnitte erlauben jedoch keine Aussage über die Natur dieses Netzwerkes. Die zentralen Partien der Interzellularsubstanzbalken enthalten colonförmig gestaltete zusammenhängende Kalkeinlagerungen, die relativ scharf gegen die Interzellularsubstanz abgegrenzt sind. Einzelne kleinere Nester von Kalknadeln

(KNESE 1959) lassen keine Ordnung der Kristalle erkennen. Die Kalknadeln sind 390 Å lang und haben eine Dicke von 20 Å[1]. Mit dem Anwachsen dieser Kristallnester kommt es zu deren Verschmelzung und zur Bildung der colonförmigen Kalkmassen.

Im *enchondralen Knochen* ist die Begrenzung der Kalkdepots im Knorpel nach Entkalkung mit Titriplex (Versen) noch eindeutig festzustellen (Abb. 3). Sie

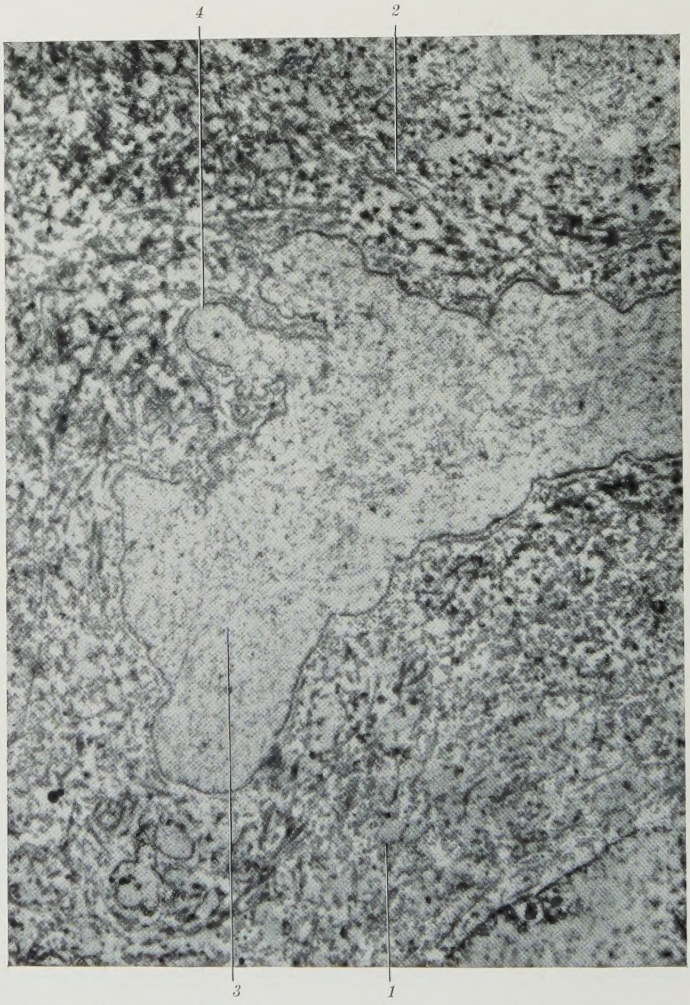


Abb. 3. Entkalkter enchondraler Knochen. *1* quergeschnittene Fibrillen; *2* längsgeschnittene Fibrillen des Knochens; *3* Gebiet des Knorpelkalkes mit granulärer bzw. fibrillärer Struktur; *4* Grenze der Kalkeinlagerungen. Entkalkung Titriplex (= Versen). Vergr. 7500

dürfte aus dicht zusammengelagerten Kollagenfibrillen bestehen. Im Bereich der Kalkablagerungen sind nur noch vereinzelt fädige Gebilde unklarer Natur, wahrscheinlich Kollagenfibrillen, aufzufinden. Eine klare Beziehung zwischen

[1] Diese Werte stellen den sog. Zentralwert für die Häufigkeitsverteilung der ausgemessenen Kalknadeln dar (vgl. KNESE und KNOOP 1958, KNESE und THEWS 1960); unterer bzw. oberer Grenzwert betragen für die Länge 248 und 614 Å, für die Dicke 12 und 35 Å.

Abb. 4. Gefäßsprossen an Querwänden in der Eröffnungszone: *1* Knorpelhöhle; *2* Längsbalken, Kalk herausgefallen; *3* Interzellularsubstanz mit Fasern in Verbindung mit einer Endothelzelle; *4* aus dem Verband gelöste Endothelzelle; *5* Endothelzelle in Verbindung mit Knorpelkalk; *6* graue Zelle mit Vakuolen, Mitochondrien, wenig Membranen des endoplasmatischen Retikulum; *7* Vakuolen mit organischem Detritus (?); *8* Anlagerung der grauen Zelle an Knorpelkalk; *9* Helle Zelle (im Zerfall?). Vergr. 3600

Kalkkristallen und Fibrillen wie im Knochengewebe besteht bei diesen Kalkablagerungen jedoch nicht.

In der *Eröffnungszone* treten an die Querbalken der knorpeligen Interzellularsubstanz Gefäßsprossen heran (Abb. 4). Ihre langgestreckten Endothelzellen

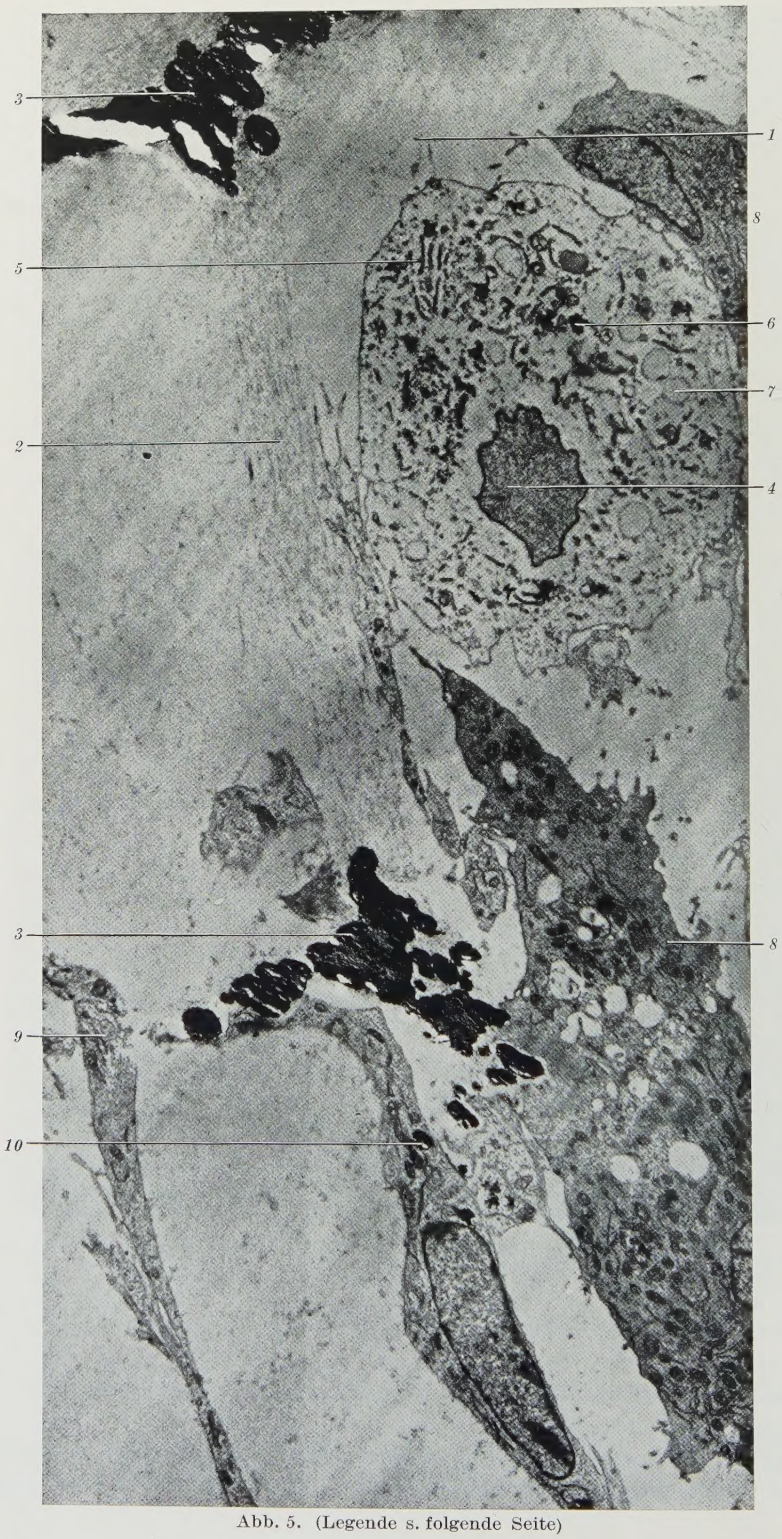


Abb. 5. (Legende s. folgende Seite)

besitzen ein recht dichtes Hyaloplasma, ein spärlich entwickeltes endoplasmatisches Retikulum und einzelne Mitochondrien. Ausläufer dieser Zellen stehen

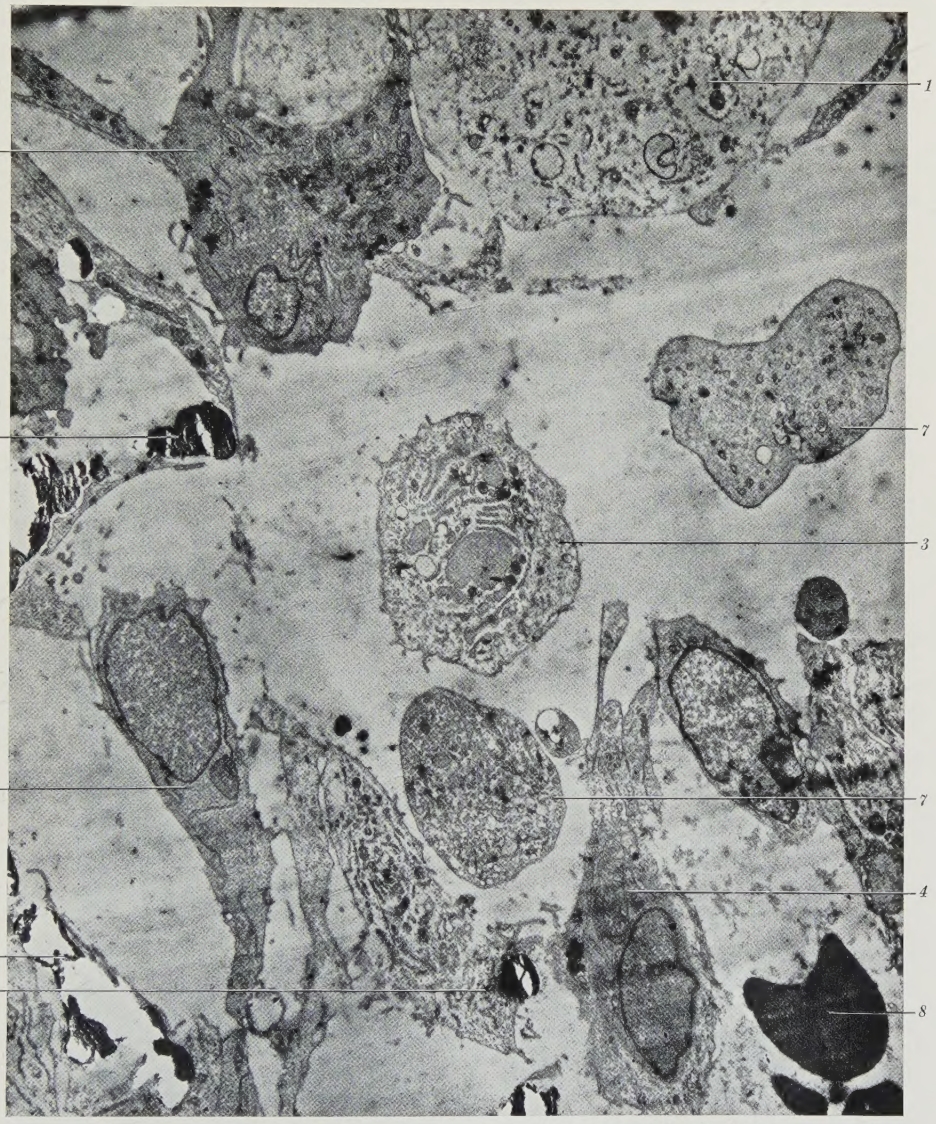


Abb. 6. Eröffnungszone: *1* Chondrocyt; *2* graue Zelle in Verbindung mit Endothelzellen; *3* helle Zelle mit großen Zisternensäcken; *4* helle Zelle (?); *5* Helle Zelle mit Kalk in Verbindung; *6* perivaskulärer Fibroblast; *7* Anschnitt durch einen Fibroblasten (?); *8* Erythrocyt; *9* Knorpelkalk. Vergr. 4200

in unmittelbarem Kontakt mit der organischen Interzellularsubstanz des Knorpels. Die Kollagenfibrillen des Knorpels berühren die Endothelzellen.

Abb. 5. Eröffnungszone: *1* Knorpelhöhle; *2* Längsbalken aus organischer Interfibrillärsubstanz; *3* Knorpelkalk; *4* Chondrocytenkern; *5* endoplasmatisches Retikulum; *6* osmiophile Einlagerungen; *7* Vesikel (erweiterte Zisternen?); *8* graue Zellen; *9* Endothelzelle eine Querwand durchbrechend; *10* Endothelzelle mit Kalkeinschlüssen. Vergr. 3500

Fortsätze der Endothelzellen oder aus dem Endothelverband gelöste Zellen scheinen die relativ dünnen Querwände der knorpeligen Interzellularsubstanz zu durchbrechen und damit Knorpelhöhlen zu eröffnen. Im Eröffnungsgebiet sind auch Zellformen zu beobachten, deren Herkunft nicht klar auszumachen ist (Abb. 5). Zum Teil handelt es sich, der Lage nach zu schließen, um perivaskuläre

Abb. 7. Helle Zelle: *1* Zellkern; *2* Nukleolus; *3* Membranen des endoplasmatischen Retikulum; *4* Zisternensack; *5* osmiophile Einlagerung; *6* Bezirke homogenen Grundplasmas; *7* Mitochondrien; *8* Zellwand mit Füßen. Vergr. 3500

Zellen, dann wohl um Elemente, die am Ende eines Gefäßsprosses wenigstens teilweise aus dem Endothelverband treten. Das granuläre Cytoplasma beider Zellformen ist ähnlich wie jenes der Endothelzellen strukturiert. Es enthält fast kein endoplasmatisches Retikulum, jedoch eine Reihe ovoider oder stäbchenförmiger Mitochondrien mit Cristae mitochondriales. In der Nähe von Kalkeinlagerungen in den Knorpellängssparren ist das Cytoplasma häufig homogen

oder feinkörnig strukturiert. Die beschriebenen Zellen schieben sich nach Durchbrechung der Querwände entlang den Längsbalken in die Knorpelzellhöhlen hinein. Die Endothelzellen nehmen ebenfalls enge Beziehungen zum Knorpelkalk auf. Sie „umfließen" Kalkdepots; abgesprengte Teile dieser Depots werden in vakuoläre Räume eingeschlossen (s. unten).

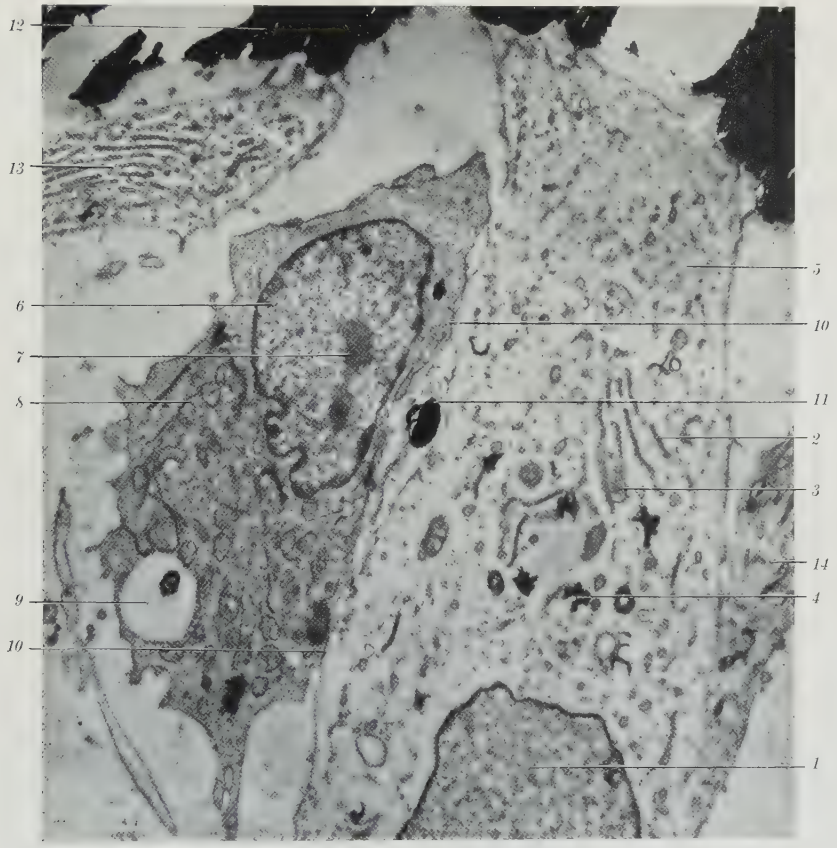


Abb. 8. Helle und graue Zellen in Kontakt miteinander: Helle Zelle: *1* Kern mit locker angeordnetem Chromatin; *2* endoplasmatisches Retikulum; *3* Mitochondrien; *4* osmiophile Einlagerungen; *5* Grundplasma mit wenig Granula. Graue Zelle: *6* Zellkern mit randständigem Chromatin; *7* Nukleolus; *8* feinkörniges dichtes Grundplasma mit Mitochondrien, einigen Membranen und osmiophilen Einlagerungen; *9* Vakuole; *10* Kontakt zwischen grauer und heller Zelle; *11* Kalkbrocken zwischen beiden Zellen; *12* Knorpelkalk; *13* helle Zelle mit größerer Anzahl von Doppelmembranen; *14* Fibroblast. Vergr. 5800

Manche Beobachtungen sprechen dafür, daß den Gefäßsprossen fibroblastenähnliche Zellen vorauswandern (Abb. 4, 6). Allerdings sind die topographischen Verhältnisse in der Eröffnungszone bereits lichtmikroskopisch und noch mehr elektronenmikroskopisch sehr schwer zu beurteilen.

Neben Zellen, die sich den stehengebliebenen Knorpelspangen anlegen, und Gefäßsprossen findet sich in der Eröffnungszone eine Ansammlung isolierter Zellen. Ihre Isolation kann durch Schrumpfung vorgetäuscht sein. Die Möglichkeit, daß es sich um wandernde oder frei bewegliche Zellen handelt, läßt sich nicht ausschließen. Unter den isolierten Zellen sind 2 verschiedene Formen zu beobach-

ten, die zunächst als *helle* und dunkle bzw. *graue Zellen* unterschieden werden sollen.

Die *hellen Zellen* sind den hypertrophen Knorpelzellen sehr ähnlich. Sie liegen in den eben eröffneten Knorpelhöhlen bzw. mehr oder minder frei in der primären Markhöhle (Abb. 5, 6). Es handelt sich um Elemente mit einem größeren

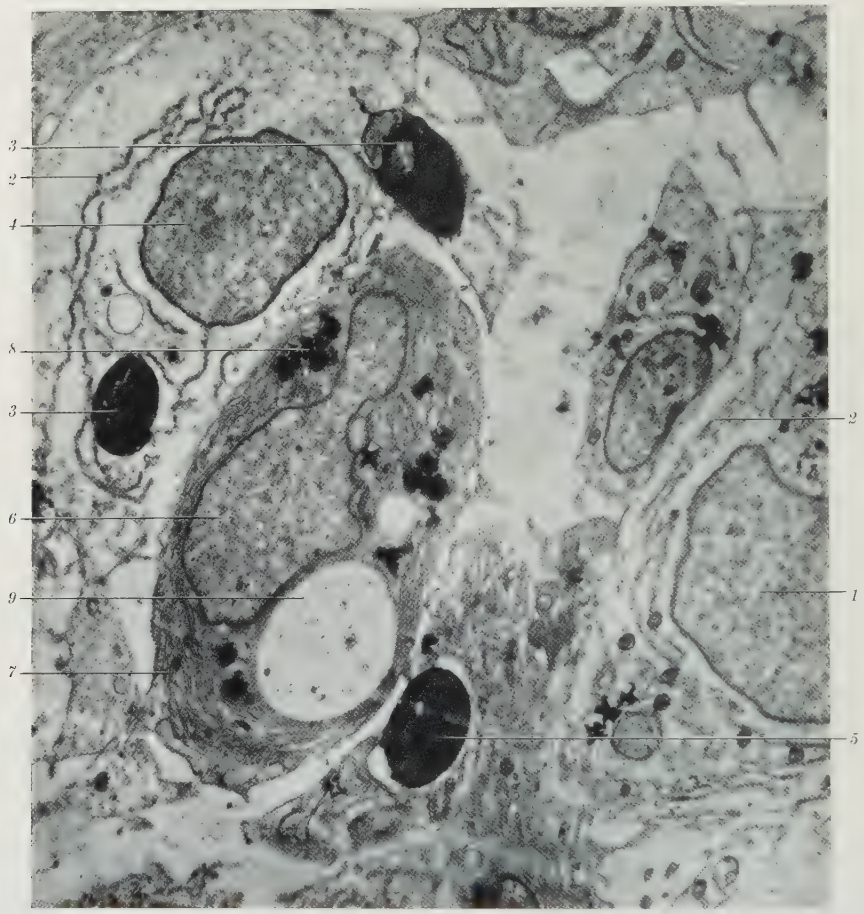


Abb. 9. Helle Zellen in der Eröffnungszone: *1* Zellkern; *2* endoplasmatisches Retikulum; *3* elliptische Einschlüsse; *4* Zisternensack; *5* elliptische Einschlüsse einer nicht mehr bestimmbaren Zellform (Übergang zwischen heller und grauer Zelle?); *6* Zellkern einer Zelle, die als Übergang zwischen grauer und heller Zelle anzusehen ist; *7* stark ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum in dichtem Grundplasma; *8* osmiophile Einschlüsse; *9* Vakuolen. Vergr. 5100

ovalen oder langgestreckten Zellkörper und einem häufig exzentrisch gelegenen Kern (Abb. 7) mit Nucleolus und netzig strukturiertem Chromatin. Ihr Grundplasma erscheint etwas dichter als das der hypertrophen Knorpelzellen. Das endoplasmatische Retikulum besteht aus klar ausgeprägten Membranen mit Palade-Granula; in manchen Zellabschnitten treten auch vereinzelt liegende Palade-Granula auf. Der Zisternenspalt ist von einer dichten Substanz erfüllt. Die Zisternen zeigen mitunter kleinere Erweiterungen, aber auch größere Säcke, wie sie bei den Knorpelzellen beobachtet wurden (KNESE und KNOOP 1961). Die

Anzahl der Mitochondrien ist relativ gering. Die hellen Zellen unterscheiden sich jedoch deutlich von jenen des Epiphysenknorpels, da sie eine größere Anzahl sternförmiger osmiophiler Einlagerungen enthalten.

Abb. 10. Knochengewebe mit periostalen und Markosteoblasten: *1* Osteoblasten mit stark entwickeltem endoplasmatischem Retikulum; *2* Schicht eines jungen Knochengewebes, die vorwiegend aus Fibrillen aufgebaut ist; *3* kleine Kalkablagerungen im Knochengewebe; *4* präossales Gewebe; *5* Knochengewebe; *6* Markosteoblast mit den Charakteren einer hellen Zelle; *7* graue Zelle; *8* Fibroblast. Vergr. 5500

Die beschriebene Zellform stellt ein Mittelglied einer *morphologischen Reihe* dar, die mit der Zellform des verkalkten Knorpels beginnt und mit der des enchondralen Osteoblasten endet. Die Variation der Zellstruktur innerhalb dieser Reihe

ist erheblich. Einmal gehören dazu Zellen, deren Hyaloplasma elektronenmikroskopisch leer erscheint (Abb. 8, 9). Das endoplasmatische Retikulum läßt kaum einen Zisternenspalt erkennen. Daneben treten aber auch sackartige Zisternenerweiterungen auf, schließlich auch bläschenförmige Gebilde, deren Zugehörigkeit zu den bekannten Zellstrukturen nicht sicher zu bestimmen ist. Bemerkenswert sind wiederum die sternförmigen osmiophilen Einlagerungen.

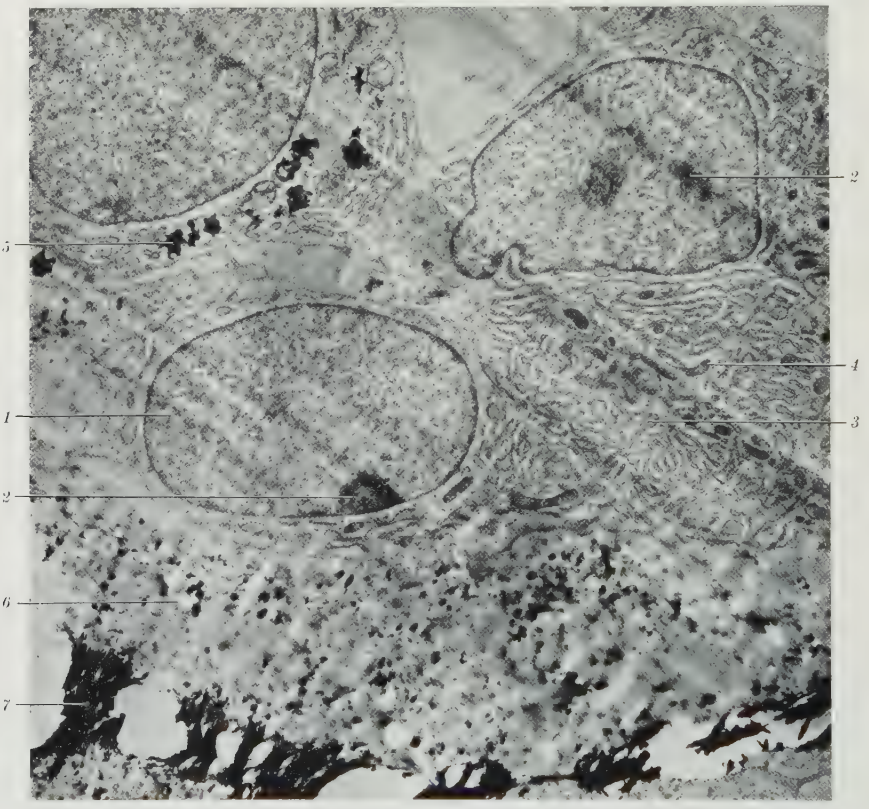


Abb. 11. Ruhende Markosteoblasten: *1* Zellkern; *2* Nukleolus; *3* endoplasmatisches Retikulum mit einigen Zisternenerweiterungen; *4* Mitochondrien; *5* osmiophile Einlagerungen; *6* homogene Schicht mit einzelnen Kalkkonkrementen; *7* Knorpelkalk. Vergr. 5100

Andere Zellen dieser Reihe zeichnen sich durch ein dichteres homogenes oder granuläres Grundplasma aus. Ihr endoplasmatisches Retikulum besteht aus kurzen Membranpaaren mit engem intermembranösem Spalt. Diese Membranpaare scheinen mitunter durch Frakturierung längerer entstanden zu sein. Ferner verzeichnet man Mitochondrien, osmiophile Einlagerungen sowie Bläschen und Einschlüsse unbekannter Natur. Zellen dieses Habitus können dem periostalen Knochen auf der Markseite anliegen (Abb. 10; vgl. KNESE und KNOOP 1958, Abb. 2).

Reife, aber vermutlich *nichttätige Markosteoblasten* besitzen wie die periostalen Osteoblasten ein stark entwickeltes endoplasmatisches Retikulum (Abb. 11). Zisternenerweiterungen sind in nicht allzu großer Anzahl vorhanden. Auffällig

gegenüber den periostalen Osteoblasten ist der Reichtum der Markosteoblasten an größeren, zum Teil schlauchförmigen Mitochondrien, sowie das Auftreten von osmiophilen Körpern.

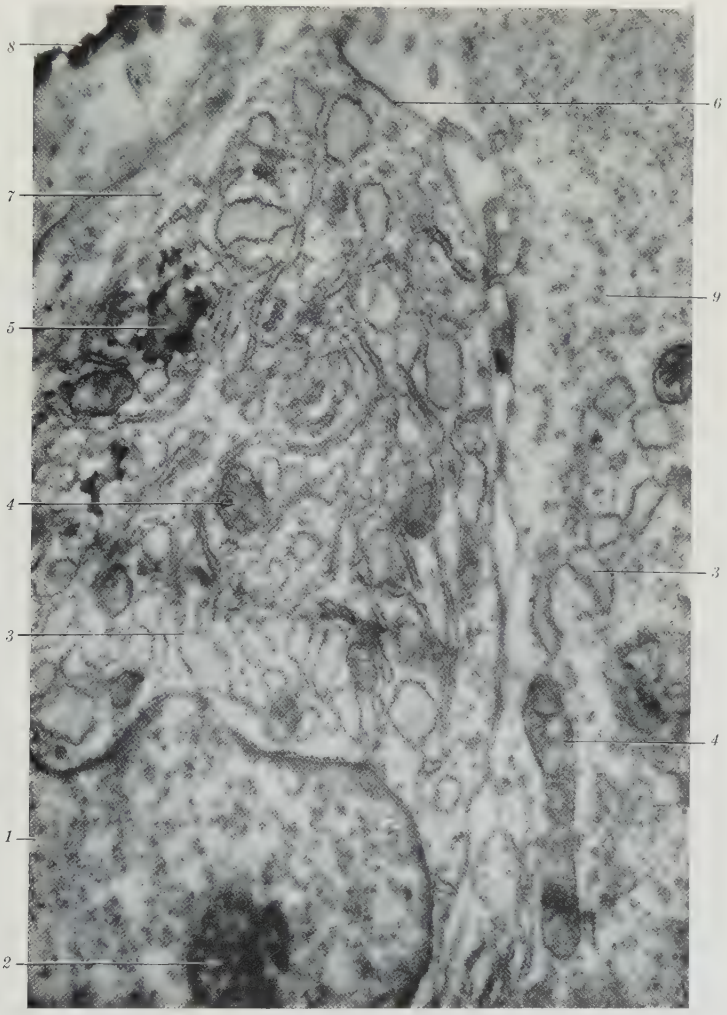


Abb. 12. Tätiger Markosteoblast: *1* Zellkern; *2* Nukleolus; *3* endoplasmatisches Retikulum mit erweiterten Zisternen; *4* Mitochondrien; *5* osmiophile Einlagerungen; *6* Zellmembran; *7* präossales Gewebe in innigem Kontakt mit dem Osteoblasten; *8* Knorpelkalk, zum Teil herausgefallen; *9* benachbarte Zelle, deren Grundplasma fast nur aus Granula besteht. Vergr. 12000

Aktive Markosteoblasten tragen folgende Merkmale: Ihre Kerne weisen — ähnlich wie die Zellkerne der periostalen Osteoblasten — ein gröberes brockenartiges, über den Kernraum verteiltes Chromatin und einen recht dichten Nucleolus auf (Abb. 12). Die Anzahl der erweiterten Zisternenabschnitte hat sich vermehrt. Das Hyaloplasma besitzt eine gröbere granuläre Struktur. Mitochondrien sind den Membranen des endoplasmatischen Retikulum unmittelbar angelagert. Die osmiophilen Körper bleiben erhalten. Die Zellmembran ist im größeren Teil

des Umfanges scharf gezeichnet, erscheint aber in Nachbarschaft des präossalen Gewebes verschwommen oder ist nicht erkennbar.

Strittig ist die Eingliederung eines besonderen Zellelementes (Abb. 13) in unsere morphologische Reihe. Im Gegensatz zu anderen, ebenfalls isoliert gelegenen Zellen besitzt es ein ungewöhnlich dichtkörniges Hyaloplasma. Sein

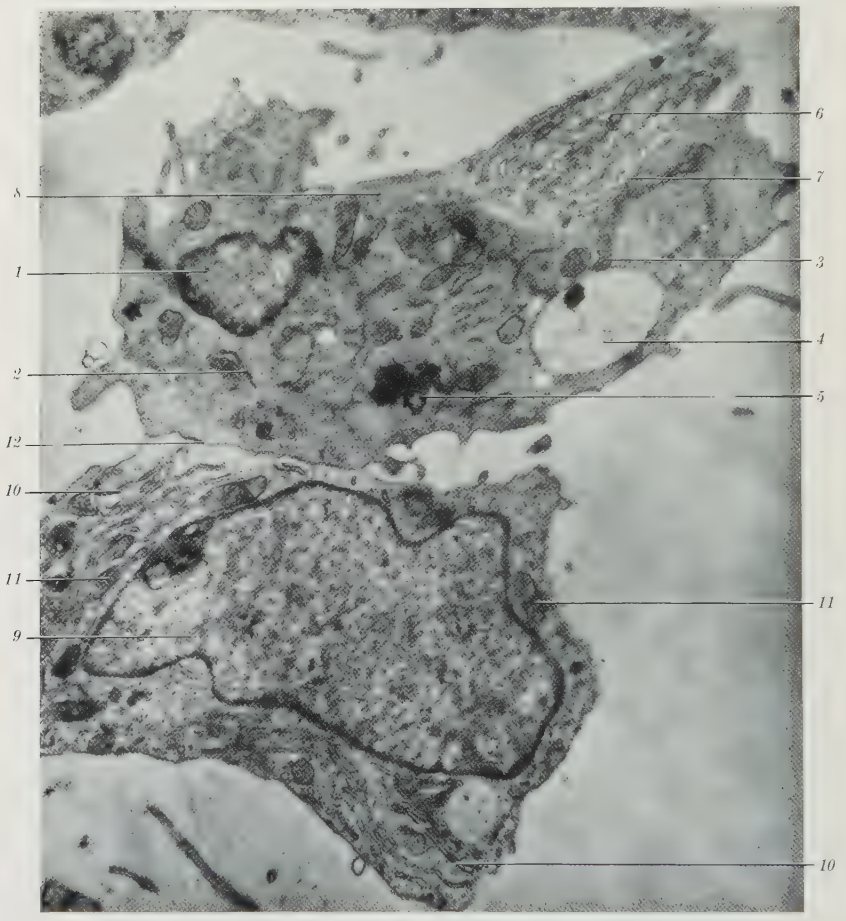


Abb. 13. Graue und helle Zelle: Graue Zelle: *1* Zellkern mit verklumptem Chromatin; *2* granuläres Grundplasma mit einzelnen Doppelmembranen; *3* Mitochondrien; *4* Vakuolen; *5* osmiophile Einlagerungen; *6* Zellabschnitt, der voraussichtlich mit der grauen Zelle verschmilzt; *7* Zellmembran; *8* Verschmelzungsbereich. Helle Zelle: *9* Zellkern; *10* endoplasmatisches Retikulum; *11* Mitochondrien; *12* Kontaktbereich. Vergr. 7 500

endoplasmatisches Retikulum ist indessen wie bei den bisher geschilderten Zellen ausgebildet; eine mäßige Zahl von Mitochondrien ist vorhanden. Diese Zelle tritt wie alle anderen in Gemeinschaft mit einer „grauen" Zelle auf. Es sei darauf hingewiesen, daß die Zuordnung einer Reihe von Zellen der Eröffnungszone zu den unterschiedenen Formen, Fibroblasten, helle und graue Zellen, nicht ohne weiteres möglich ist.

In der Eröffnungszone im engeren Sinne nehmen fast regelmäßig jeweils eine graue und eine helle Zelle auf eine größere Strecke hin mit ihren Zellmembranen

Kontakt auf (Abb. 8, 13). Diese Anlagerung unter Bildung eines feinen interzellulären Spaltes kann auf längere Strecken hin erfolgen, bzw. es finden sich im Kontaktbereich mehrere Berührungspunkte, die mit etwas weiteren interzellularen Spalträumen abwechseln.

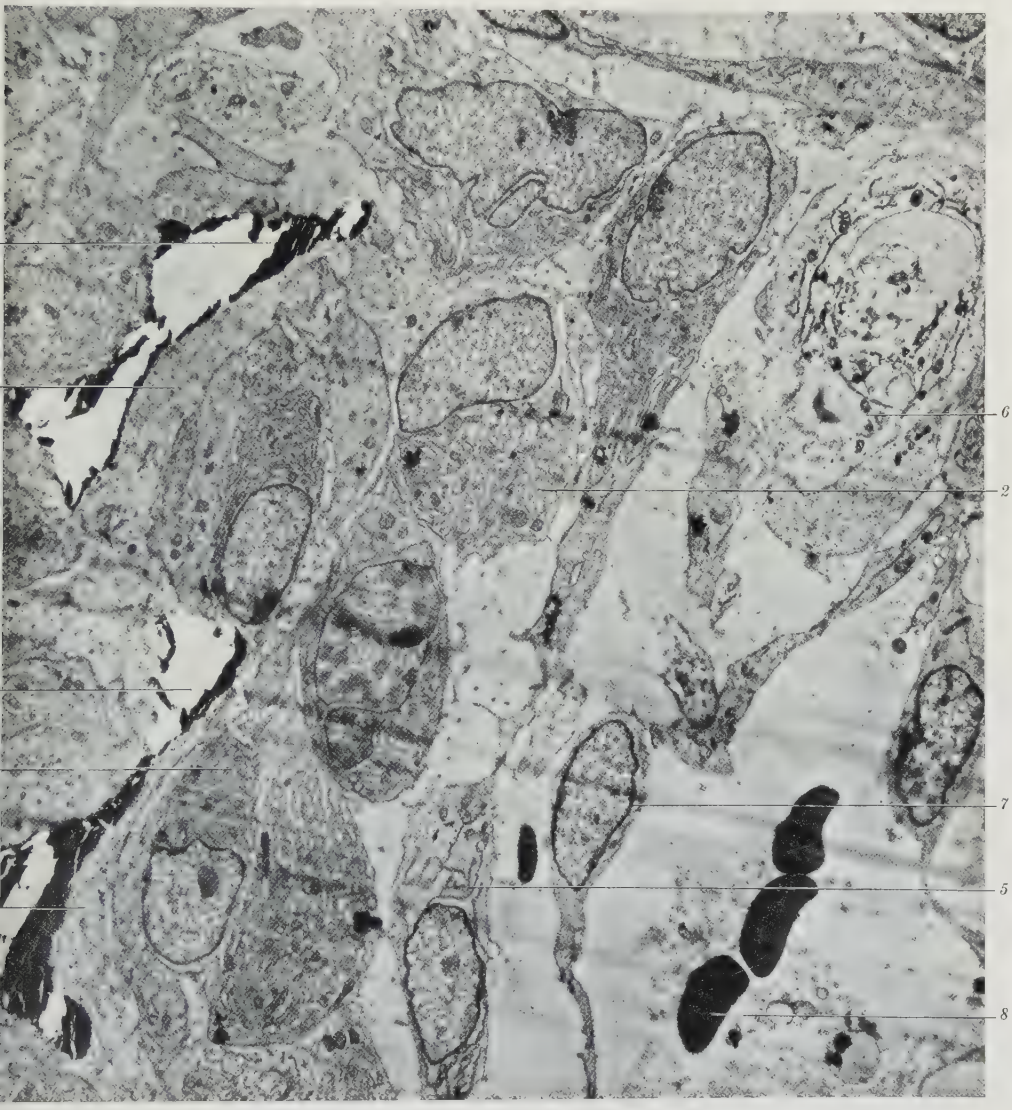


Abb. 14. Markosteoblasten auf einem Knorpellängsbalken: *1* Knorpelkalk, teilweise herausgefallen; *2* Schicht der Markosteoblasten; *3* präossales Gewebe; *4* homogene Schicht auf dem Knorpelkalk; *5* Fibroblast; *6* helle Zelle, vielleicht im Zerfall; *7* Gefäßendothel; *8* Erythrocyt. Vergr. 4200

Die *grauen Zellen* sind bereits in den soeben eröffneten Knorpelhöhlen zu beobachten, wo sie sich den hypertrophen Knorpelzellen anlagern (Abb. 4—6). Ihre Herkunft ist nicht unmittelbar zu bestimmen. Sie treten jedenfalls perivaskulär auf bzw. erscheinen im Zusammenhang mit jenen Zellen, die dem Gefäßsproß vorauswandern.

Die Struktur der grauen Zellen unterscheidet sich grundsätzlich von der der hellen Zellen. Der meist mit Einbuchtungen versehene Kern ist im Vergleich zur Zellgröße relativ klein (Abb. 8, 13). Das Chromatin legt sich der Kernmembran in einer dicken, dichten Schicht an und ist im übrigen über den Kernraum unregelmäßig netzartig verteilt; ein Nucleolus kann vorhanden sein. Der Zellkörper

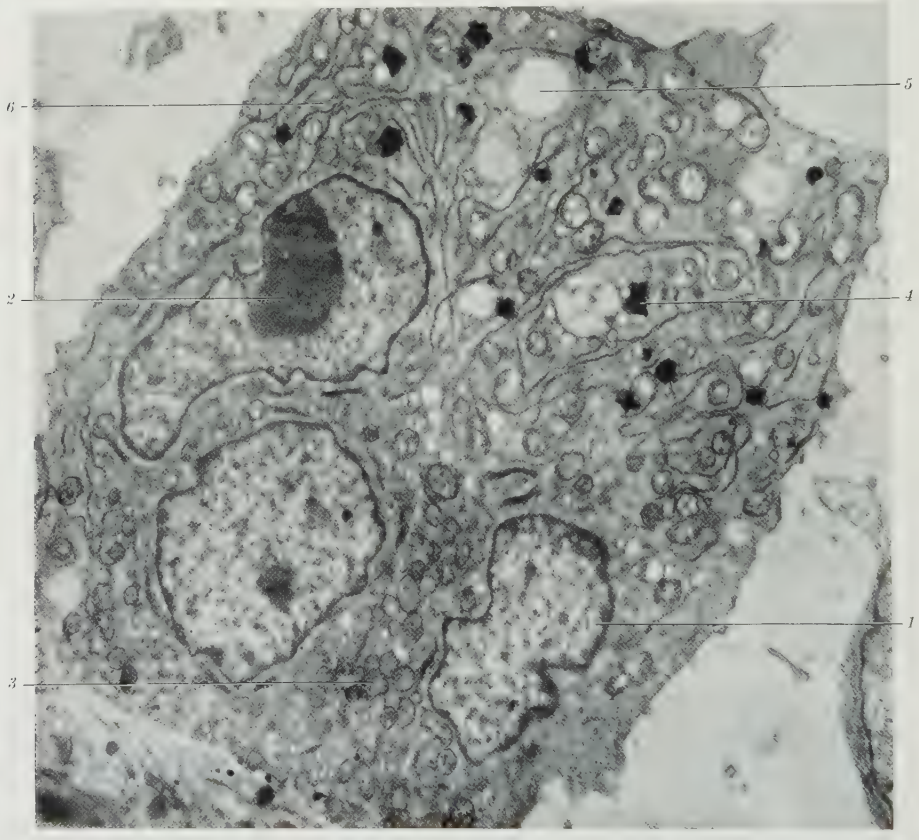


Abb. 15. Riesenzelle: *1* Zellkerne mit verklumptem Chromatin; *2* Nukleolen; *3* Mitochondrien; *4* osmiophile Einlagerungen; *5* Vakuolen; *6* endoplasmatisches Retikulum. Vergr. 7000

besitzt eine Reihe verschieden großer, mitunter lappenförmiger Fortsätze. Das ungewöhnlich dichte Cytoplasma besteht aus einem feinkörnigen Grundplasma, in das größere Granula (Palade-Granula ?) eingelagert sind. Die „grauen Zellen" im Bereich der Eröffnungszone enthalten eine größere Anzahl von rundlichen bis länglich-ovalen Mitochondrien mit Cristae und einer dichten Matrix. Ein endoplasmatisches Retikulum fehlt bzw. es ist nur durch einzelne diffus verteilte Membranen vertreten.

Die oben beschriebenen Elemente (Abb. 13) wurden in die Reihe der hellen Zellen eingeordnet, da ein reichlich ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum sowie ein im Vergleich zum Zelleib relativ großer Kern mit gleichmäßig verteiltem Chromatin ohne dichtere Ansammlungen an der Kernmembran vorliegt. Allerdings könnte hier auch eine Übergangsform zwischen beiden Reihen vorliegen.

In der Struktur einer weiteren Zelle (Abb. 9) treten Eigentümlichkeiten beider Zellformen in Erscheinung. Sie erinnert bezüglich Kerngröße, Kernstruktur, des endoplasmatischen Retikulums und der lipoiden Einlagerungen an eine helle Zelle, hinsichtlich des dichten, feingranulären Grundplasma und einer größeren Vakuole an eine Zelle der „grauen" Reihe.

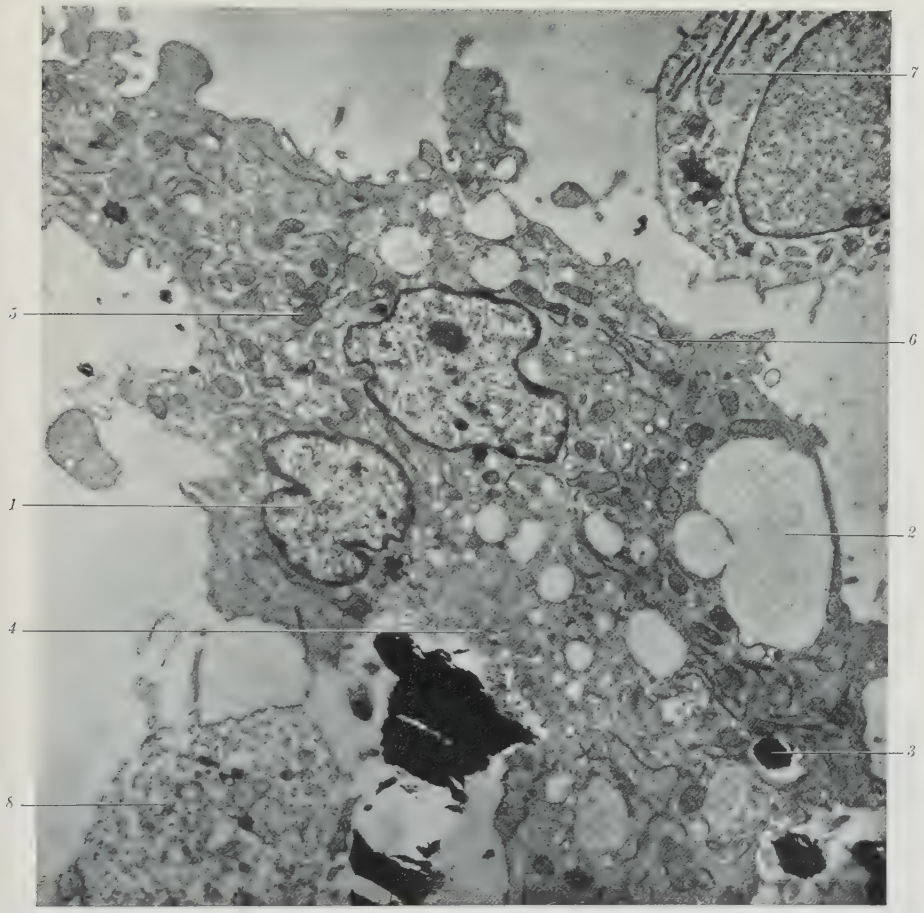


Abb. 16. Riesenzelle an Knorpelkalk angelagert: *1* Zellkern; *2* Vakuolen; *3* eingeschlossener Knorpelkalk; *4* homogene Zone in Nachbarschaft eines Resorptionsgebietes; *5* Mitochondrien; *6* Membranpaare; *7* helle Zellen mit wohlausgebildeten Membranen; *8* helle Zelle mit granulärer Struktur. Vergr.: 6000

Im allgemeinen besitzen die grauen Zellen der Eröffnungszone eine, mitunter 2 Vakuolen, die elektronenmikroskopisch leer erscheinen bzw. eine fädig-granuläre Substanz geringer Dichte oder Einlagerungen enthalten.

Bevor ähnliche, in größerer Entfernung von der Eröffnungszone gelegene Zellformen geschildert werden, sei kurz auf den *Aufbau der Längssparren der Knorpelsubstanz* eingegangen, die nach Verschwinden der Querbalken stehenbleiben. In der Mineralisationszone des Knorpels sind die *Kalkdepots* von einer Interzellularsubstanz umgeben, die Fibrillen enthält. Unmittelbar bei Eröffnung sind die Kalkeinlagerungen mitunter noch von fibrillenhaltiger Interzellular-

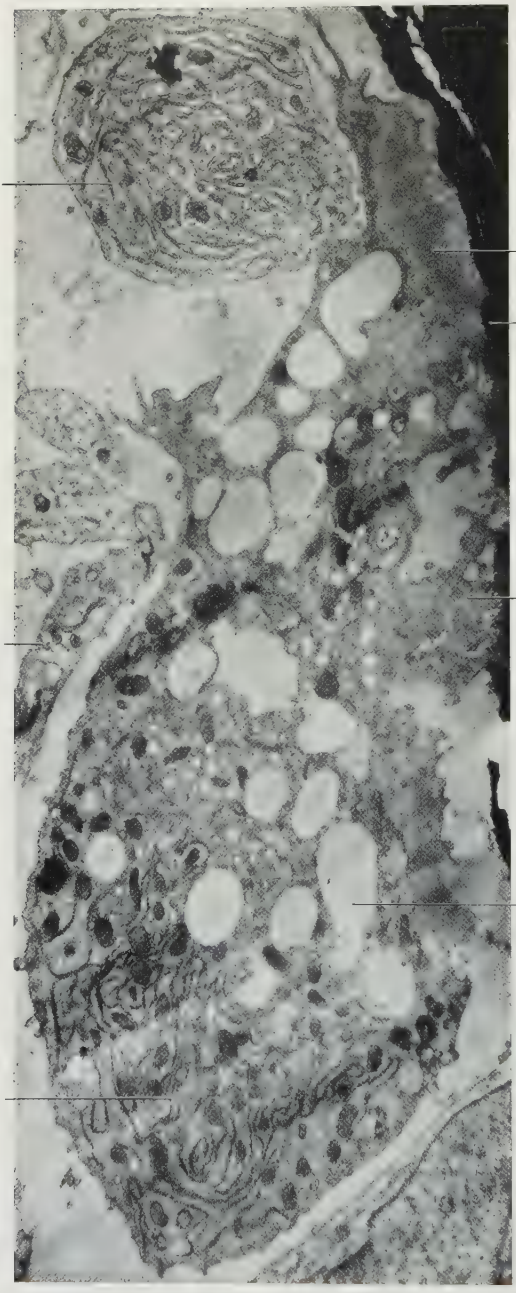


Abb. 17. Riesenzelle in flächenhaftem Kontakt mit Knorpelkalk: *1* kalkferner Zellabschnitt mit Membranen und Mitochondrien; *2* vakuoläre Zone; *3* homogener Zellabschnitt mit Buchten; *4* Knorpelkalk; *5* helle Zelle; *6* Gefäßendothel. Vergr. 6000

substanz überkleidet. Den Knorpelbalken legen sich Epithelsprossen, perivaskuläre und graue, aber auch helle Zellen an. Wenn derartige Zellen Kontakt mit der Knorpelsubstanz aufgenommen haben, ist eine umhüllende faserige Interzellularsubstanz der Kalkdepots nicht mehr zu beobachten. Alle Zellarten „umfließen" die nunmehr nackten Kalkmassen (Abb. 4, Gefäßendothel, Abb. 5 graue Zelle, Abb. 6 helle Zelle), wodurch die zunächst unveränderten Kalkkonkremente in eine Art Vakuole eingeschlossen werden. In gewissem Abstande von der Eröffnungszone weisen die Kalkreste des Knorpels wiederum eine organische Umhüllung auf (Abb. 15) und zwar liegen zwischen den benachbarten Zellen und den Kalkdepots homogene strukturlose Bezirke unklarer Natur. Aber auch präossale Säume mit einer geringen Fibrillendichte erscheinen.

In einiger Entfernung von der Eröffnungszone haben nur noch die inzwischen umgestalteten grauen Zellen engere Beziehungen zu den Kalkdepots. Die anderen genannten Zellformen lagern sich den Kalkbalken offenbar nur an. In der Eröffnungszone sind die grauen Zellen einkernig. Die in Abb. 6 wiedergegebene Zelle zeigt wahrscheinlich angeschnittene Kernlappen und nicht mehrere Kerne. Abb. 13 läßt an eine Zellverschmelzung denken. An Zellen, die sich aneinanderlagern, ist die Zellmembran streckenweise noch deutlich erkennbar; die Struktur der beiden Zellkörper wird annähernd gleichartig.

Die grauen Zellen treten in größerem Abstand von der Eröffnungszone als mehrkernige *Riesenzellen* mit grob gelappten Kernen, die Nukleolen enthalten, auf

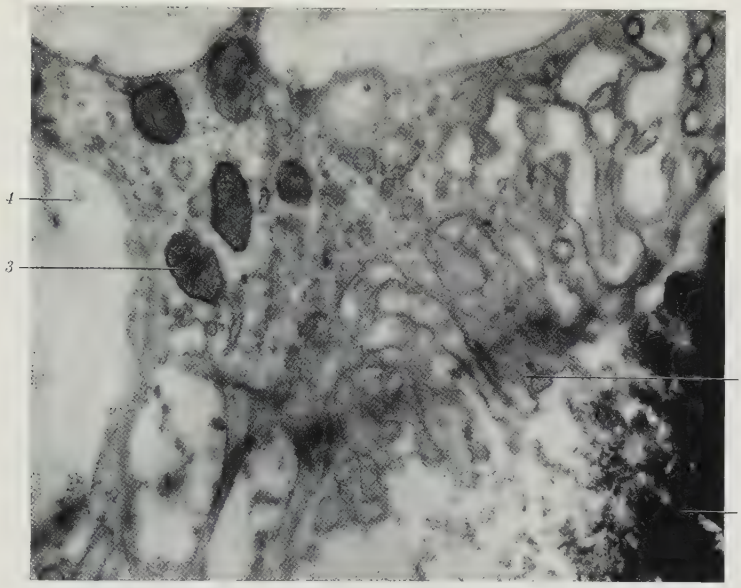


Abb. 18. Teil einer Riesenzelle mit Buchten der Zelloberfläche: *1* Knorpelkalk; *2* Buchten der Zelloberfläche; *3* Mitochondrien; *4* Vakuolen. Vergr. 17 000

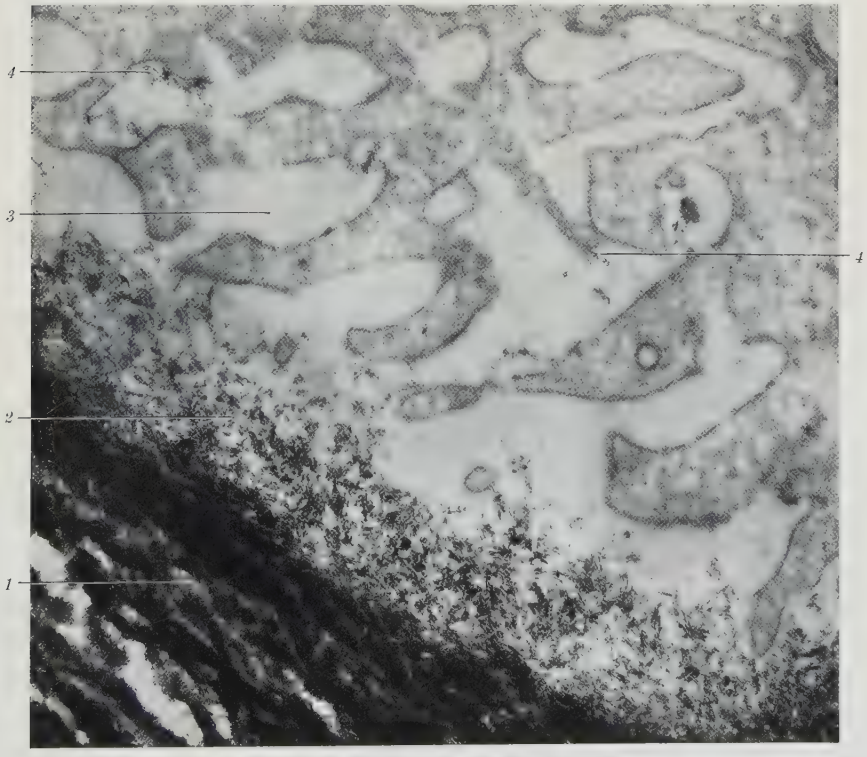


Abb. 19. Teil einer Riesenzelle mit Buchten der Zelloberfläche: *1* dichter Knorpelkalk; *2* Knorpelkalk in Auflösung; *3* Buchten der Zelloberfläche; *4* Kalknadeln in Kontakt mit der Zellmembran. Vergr. 22 000

(Abb. 15). Die Chromatinanlagerung an die Kernmembran ist nicht mehr so ausgeprägt wie bei den einkernigen grauen Zellen. Zahlreiche, im Cytoplasma liegende kleinere und größere Vakuolen erscheinen elektronenmikroskopisch leer oder enthalten eine geringe Menge feinkörniger Substanz. Der Reichtum an

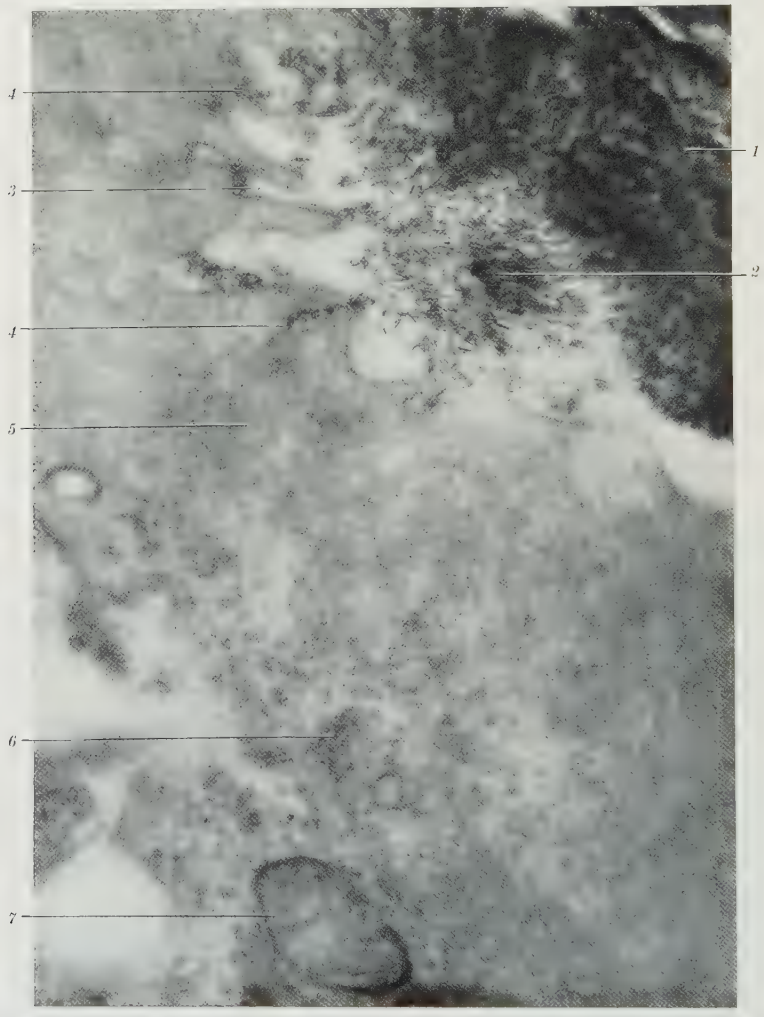


Abb. 20. Teil einer Riesenzelle mit homogenem Randsaum: *1* dichter Knorpelkalk; *2* Kalk in Auflösung; *3* Buchten der Zelloberfläche; *4* Kalknadeln in Kontakt mit der Zellmembran, zum Teil wie in Vakuolen (Buchten?) eingeschlossen; *5* homogener Randsaum; *6* granuläres Grundplasma; *7* Mitochondrien. Vergr. 45000

kleineren rundlichen oder ovoiden Mitochondrien mit im allgemeinen dichter Matrix ist beachtlich. Das Cytoplasma ist teilweise sehr feinkörnig, fast homogen strukturiert. Selten treten größere Granula (Palade-Granula?) auf. Das im allgemeinen schwach entwickelte endoplasmatische Retikulum ist auf einzelne Zellabschnitte, zumeist die kalkfernen, beschränkt. Mitunter ist allerdings die Anzahl der Membranen vermehrt; die intermembranösen Spalten sind sehr eng. Osmiophile Einlagerungen sind in geringer Menge vorhanden.

Die Beziehungen dieser Riesenzellen zu den Kalkdepots wechseln. Häufig werden Kalkmassen umflossen und scheinbar in Zellvakuolen aufgenommen (Abb. 16). In anderen Fällen kommt es zu einem mehr oder minder ausgiebigen flächenhaften Kontakt zwischen Riesenzellen und Kalkdepots (Abb. 16, 17). Das Cytoplasma der Riesenzellen in der Nähe dieses Kontaktbereiches wandelt sich beträchtlich um. Ein endoplasmatisches Retikulum fehlt, dagegen sind viele Vakuolen verschiedenster Größe und Mitochondrien vorhanden. An die

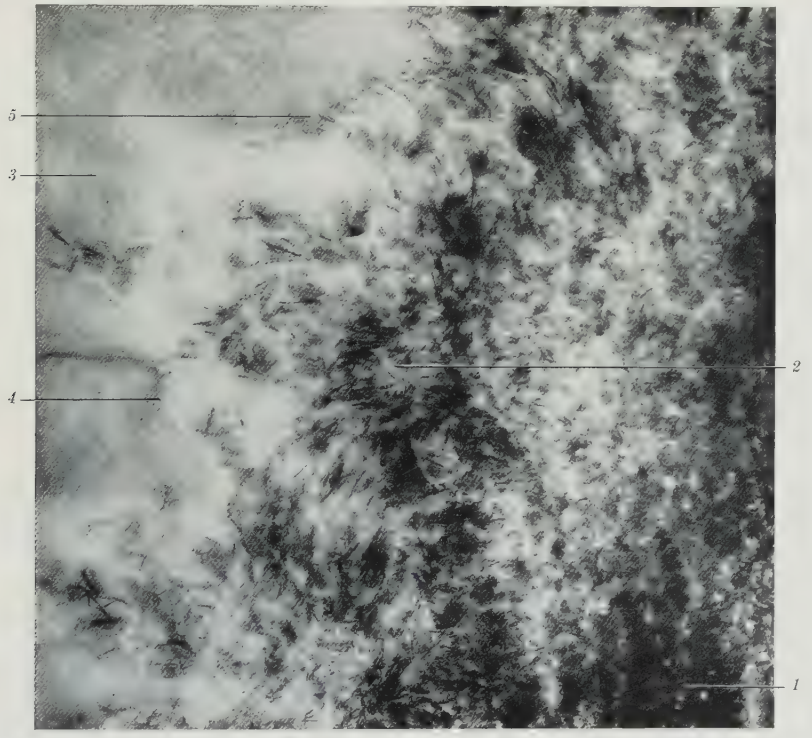


Abb. 21. Teil einer Riesenzelle mit homogenem Randsaum: *1* dichter Knorpelkalk; *2* Kalk in Auflösung; *3* homogener Randsaum; *4* Zellmembran; *5* Kalknadeln in unmittelbarem Kontakt mit dem homogenen Randsaum. Vergr. 100 000

Stelle des feingranulären Cytoplasmas mit größeren Körnchen tritt in recht scharfem Übergang zum restlichen Cytoplasma ein homogener Saum (Abb. 17, 20). Dieser Saum kann schwach ausgebildet sein, besonders dann, wenn sich die Zelloberfläche mehrfach faltet und vorbuckelt, so daß Mikrovilli vergleichbare Erhabenheiten entstehen (Abb. 18). Der homogene Saum ist bei grob gebuchteter und gefalteter Zelloberfläche häufiger.

Im Kontaktbereich erscheinen die Kalkdepots stark aufgelockert, so daß die einzelnen Kristalle deutlich hervortreten (Abb. 19). Kleine Gruppen von Kalknadeln werden in Buchten der Zelloberfläche aufgenommen und dann in Vakuolen eingeschlossen (Abb. 20). In anderen Fällen ist eine Zellmembran an den Falten nicht mehr auszumachen; die Kalknadeln scheinen dem nackten Saum des homogenen Cytoplasmas anzulagern oder sogar in seinen peripheren Abschnitten zu liegen (Abb. 21).

Zellen gleicher Struktur beobachteten wir eingebettet zwischen Osteoblasten im Bereich der sog. freien chondralen Flächen (Resorptionsflächen von KOELLIKER 1873, vgl. KNESE 1957, BAHLING 1958). Der Kern dieser Zellen ist wiederum relativ klein (Abb. 22); ihr sehr dichtes Cytoplasma enthält osmiophile Einlagerungen, ein endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien. Auf eine

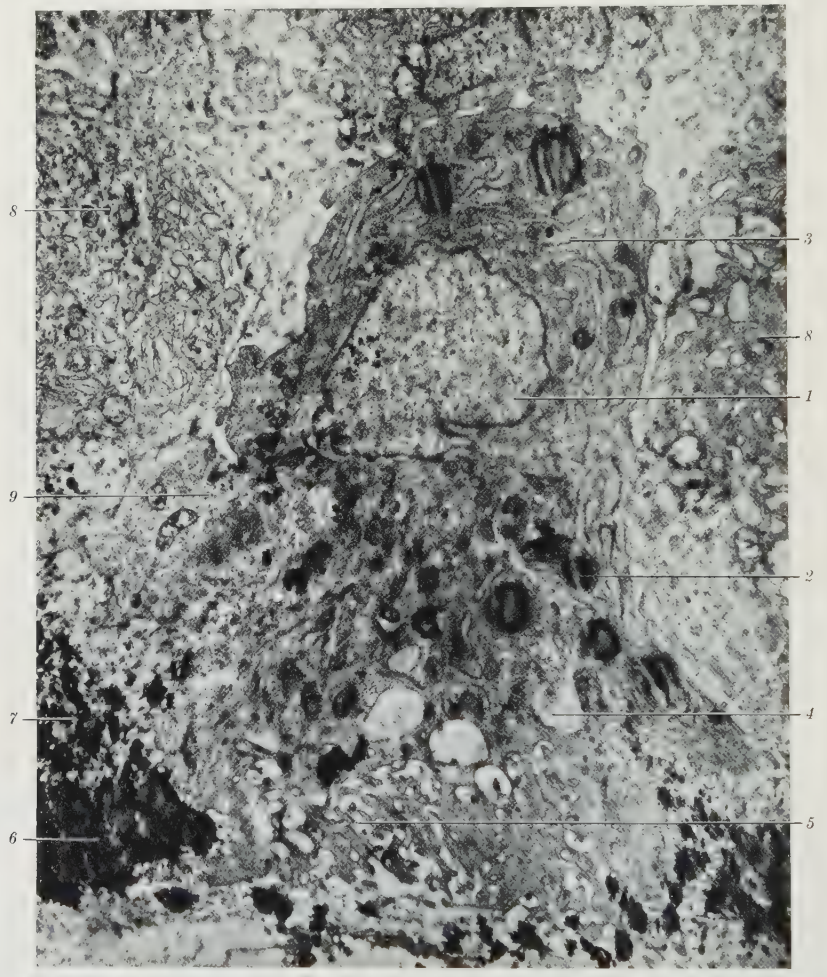


Abb. 22. Graue Zelle (Riesenzelle) aus dem Periost: *1* Zellkern; *2* osmiophile Einlagerungen; *3* endoplasmatisches Retikulum; *4* Vakuolen; *5* Zellbuchten; *6* Knorpelkalk; *7* Knochen; *8* Osteoblasten; *9* Zellabschnitte in Verschmelzung mit der Riesenzelle (?). Vergr. 5400

vakuoläre Zone folgt der homogene Randsaum. Die Zelloberfläche ist verschieden stark gebuchtet. Der eingebuchtete Zellabschnitt schiebt sich zwischen dem präossalen Gewebe hindurch an den Knorpelkalk heran, der in diesem Bereich weitgehend geschwunden ist. Zu beiden Seiten des homogenen Randsaumes liegen noch dickere kompakte Schichten von Knorpelkalk.

Schwierig zu beurteilen ist eine Reihe von Bildern des *Kalkeinschlusses in Vakuolen heller Zellen*. Diese Vakuolen haben mitunter eine deutliche Wand

(Abb. 23), die in manchen Zellen eine komplizierte Lamellenstruktur aufweist (Abb. 25). In anderen Zellen wiederum fehlt eine Wand (Abb. 24); die Kalkmassen stehen dann scheinbar in unmittelbarem Kontakt mit Cytoplasmastrukturen, z. B. Membranen des endoplasmatischen Retikulum. Auffällig ist die kernnahe Lage dieser zellulären Kalkeinschlüsse (Abb. 24). Auch enge nachbarschaftliche Beziehungen zum Golgiapparat sind festzustellen (Abb. 25).

In Zellen, die eher der hellen als der grauen Zellreihe zuzuordnen sind, finden sich im Schnitt ovale *Einschlüsse*, die durch ihre regelmäßige, ovoide Gestalt auffallen (Abb. 26); sie sind elektronenmikroskopisch ungewöhnlich dicht, so daß ihr innerer Aufbau kaum zu erkennen ist (Abb. 9) und besitzen eine einschichtige umhüllende Membran, die durch eingeschlossene, ebenfalls von Membranen umgebene Vakuolen schwach vorgebuchtet wird. Neben einem feingranulären Inhalt sind Membranpaare zu beobachten, die an die Struktur des endoplasmatischen Retikulum erinnern, Vakuolen mit einfachem und zum Teil sehr verwickeltem Wandaufbau. Auch stärkere elektronenmikroskopische Grundvergrößerungen (21000, Abb. 27) lassen nur eine Fülle von Doppelmembranen und Vakuolen verschiedenster Naturerkennen. Andere elliptoide Zelleinschlüsse enthalten zerfallende Massen ohne jede Struktur (Abb. 29).

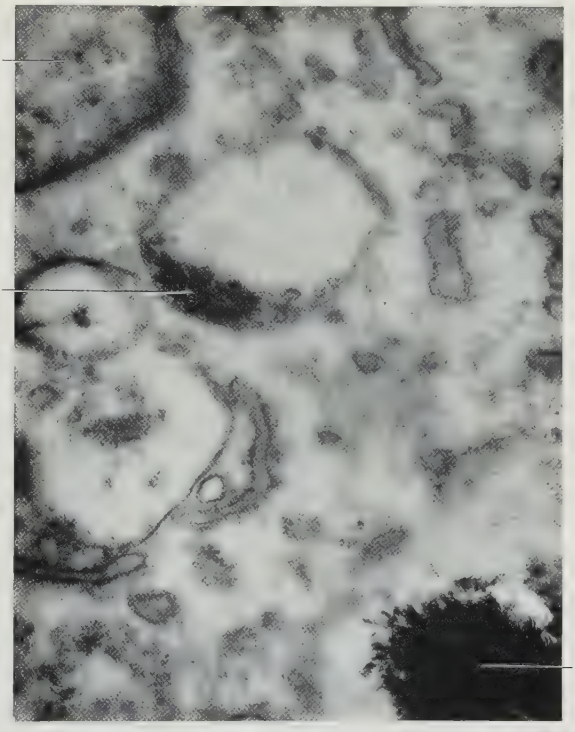


Abb. 23. Ausschnitt einer hellen Zelle mit eingeschlossenem Kalk: *1* Zellkern; *2* Kalk in einer Vakuole mit Membran; *3* nackter Kalkeinschluß. Vergr. 40000

Der Inhalt der elliptoiden Einschlüsse in hellen Zellen ist zwar nicht eindeutig zu definieren; es mag sich um phagocytierte Reste zerfallener Zellen handeln. Die Struktur aller bisher beschriebenen Zellformen, die ausnahmslos von einem Plasmalemm umschlossen sind, spricht in keiner Weise für einen Zellzerfall.

Der sog. Zerfall einer Zelle scheint zunächst nicht die einzelnen Zellorganellen zu betreffen (Abb. 28, s. auch S. 30). Zerfallende Zellen besitzen keine Zellmembran. Ihr Detritus besteht aus einer feinen granulären Masse, in die von Membranen umhüllte Bläschen und osmiophile Körper eingelagert sind. Die Bläschen enthalten entweder eine homogene Substanz oder Cristae, so daß es sich um wenig veränderte Zisternen bzw. Mitochondrien handeln dürfte.

Die Abb. 28 zeigt in unmittelbarer Nachbarschaft des Detritus eine Zelle mit verwickelter Struktur. Ein größerer ovalärer Bereich des Cytoplasmas enthält ein stark ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum mit erweiterten Zisternen. Die Membranen des Retikulum stehen wie in anderen Zellen mit Mitochondrien in engem Kontakt. Einige Strukturelemente sind wahrscheinlich dem Golgiapparat zuzurechnen. Es ist anzunehmen, daß der kernhaltige Zellabschnitt zu dem kernlosen größeren gehört; die trennende Zone zwischen beiden Zellbereichen könnte eine tiefe Bucht der Zelloberfläche darstellen.

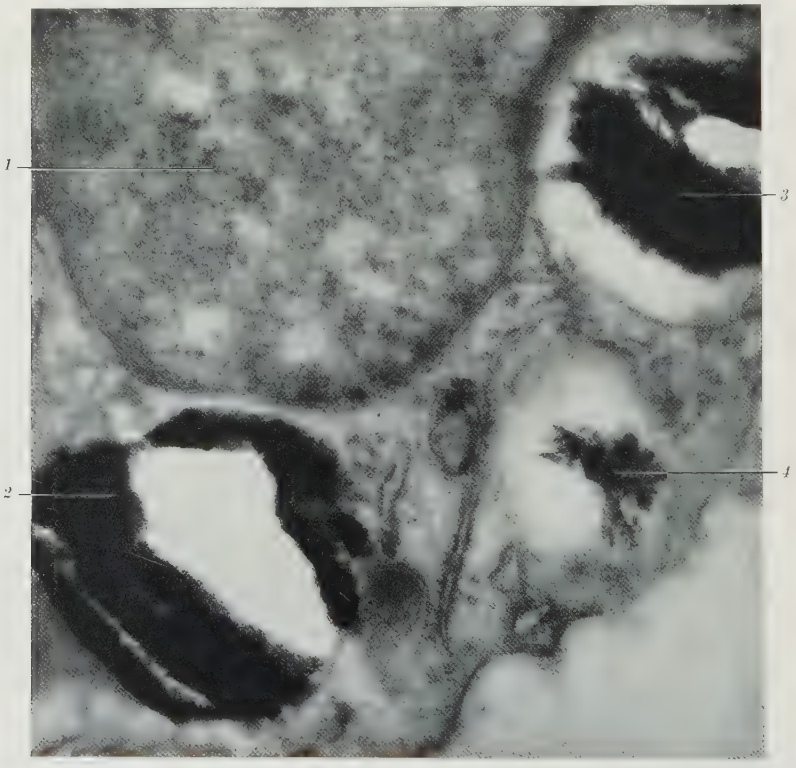


Abb. 24. Kalkeinschlüsse in einer Zelle: *1* Zellkern; *2* Kalkeinschlüsse ohne kenntliche umhüllende Membran; *3* Kalkeinschluß mit teilweiser Membranumhüllung; *4* Kalk in Auflösung (?). Vergr. 32000

Die morphologischen Beziehungen innerhalb des oben beschriebenen Zellkomplexes sind nicht einfach zu erkennen. Dies gilt auch für eine Zellgruppe, die ebenfalls der hellen Reihe zugeordnet werden kann (Abb. 29). Ein Teil ihrer Elemente besitzt, wie bereits ausgeführt, elliptische Vakuolen mit zerfallendem Inhalt. Neben relativ gut abgrenzbaren Elementen findet sich eine Zelle, die einen langen, verzweigten Fortsatz bis an ein Kalkdepot heranschiebt. Der kernnahe Abschnitt besitzt ein endoplasmatisches Retikulum, größere Granula im Grundplasma und einige Mitochondrien. Das Cytoplasma des Fortsatzes enthält längere Mitochondrien mit dichter Matrix, Bruchstücke von Membranpaaren, Vesikel, osmiophile Körper und — im Gegensatz zum übrigen Teil des Zellkörpers — ein locker gefügtes körniges Grundplasma. Der Fortsatz schmiegt sich anderen Zellen unmittelbar an und ist von einer Zellmembran umschlossen.

Eine zweite Zelle mit einer größeren Vakuole legt sich dem Fortsatz der Nachbarzelle an. Ein Teil der Zelle wurde wahrscheinlich beim Schneiden herausgerissen.

Topochemische Erhebungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Eröffnungszone stehen wie die lichtmikroskopischen vor der Schwierigkeit der Beurteilung der Zelltopographie und wechselseitigen Zellbeziehungen. Erschwerend wirkt auch die schlechte Färbbarkeit der Zellen in der Eröffnungszone.

Unser Vergleichsmaterial, der Metacarpus des Rindes, weist eine Besonderheit auf. Bei vielen Species, unter anderen dem Menschen, steht der Eröffnungszone und dem Ort der enchondralen Osteogenese eine bisher weniger beachtete diaphysäre chondrale Osteogenese gegenüber (Knese 1957). Am Metacarpus, seltener bei anderen Skelettstücken des Rindes gehen beide Knochenbildungsformen ineinander über. Die Eröffnung erfolgt nur an einem Teil der Knorpelhöhlen (Abb. 30). Dazwischen bleiben verschieden gestaltete Knorpelbalken mit Knorpelzellen in Knorpelhöhlen stehen. Diese Knorpelhöhlen werden nun in der primären Markhöhle nicht von den Querwänden her, sondern von der Längsseite aus eröffnet. Den Längsseiten liegen Zellen des Markraumes an, die ähnlich wie in der Eröffnungszone in die Knorpelhöhlen ein-

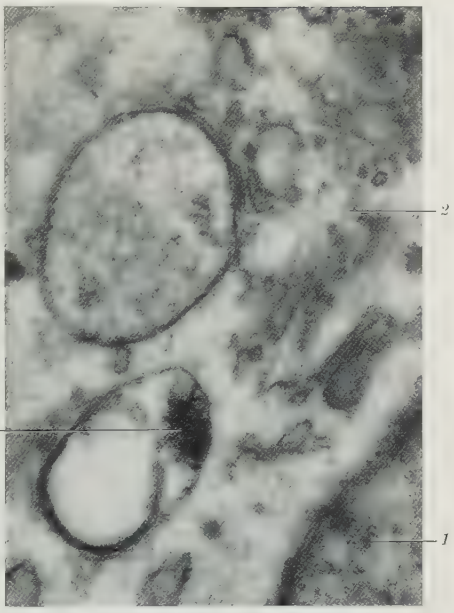


Abb. 25. Kalkeinschlüsse im Golgi-Feld: *1* Zellkern; *2* Golgi-Feld; *3* Kalkkonkremente in einer Vakuole mit Membran. Vergr. 70 000

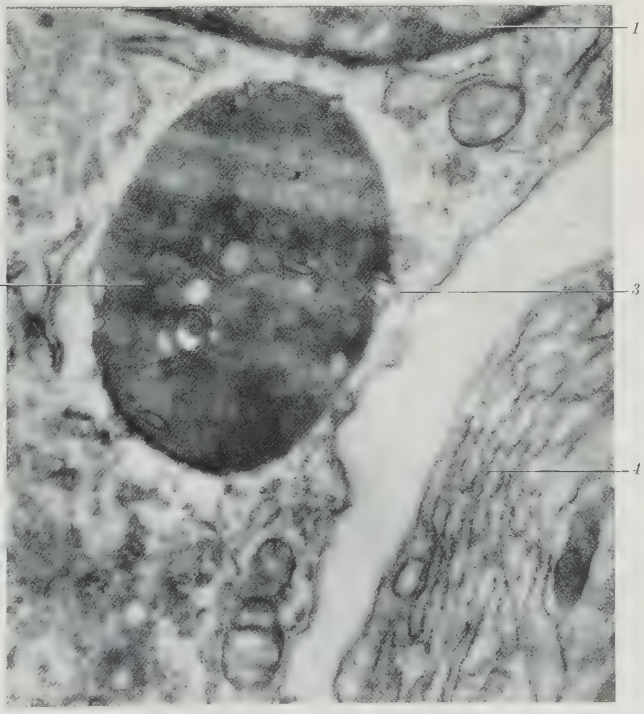


Abb. 26. Elliptische Einschlüsse in einer Zelle: *1* Zellkern; *2* elliptischer Einschluß mit Membranpaaren und Vakuolen; *3* durch Vakuolen abgehobene Membran; *4* Nachbarzelle mit stark entwickeltem endoplasmatischem Retikulum. Vergr. 26 000

dringen. Die Querwände scheinen anschließend zu verschwinden. Die damit freigelegten Zellen behalten aber ihre seriale Lage wie im Knorpel zunächst bei.

Nach der Ninhydrin-Schiff-Reaktion stellen sich die Knorpelzellen in diesen Längsbalken als Zellen mit hellem, schaumigem Cytoplasma und bläschenförmigem Kern dar. Mit der Eröffnung ändert sich die Zellstruktur: Der Kern wird relativ

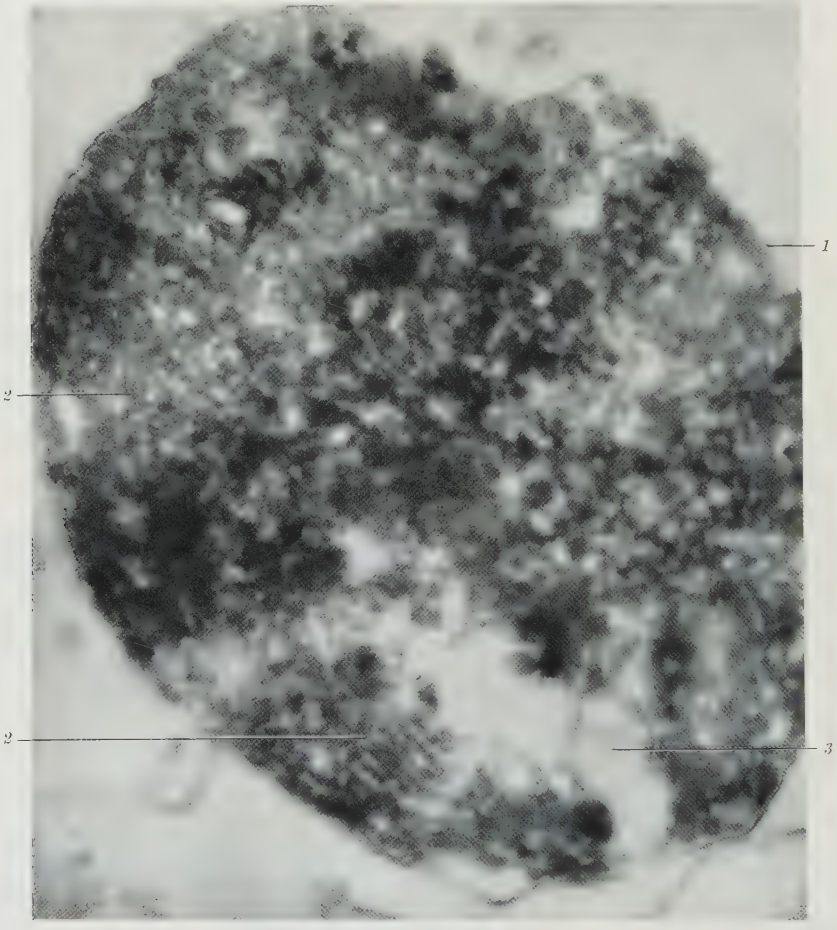


Abb. 27. Elliptischer Zelleinschluß: *1* Membranen; *2* Doppelmembranen; *3* Vakuolen. Vergr. 42000

klein und weist jetzt einen deutlichen Nucleolus auf. Das ebenfalls verkleinerte Cytoplasma färbt sich dunkel an. Nach dem Verschwinden der Querwände nehmen die zunächst kubisch geformten Zellen eine längliche Gestalt an, wobei ihre Längsachse nunmehr in Längsachse der Knorpelbalken liegt.

Das Cytoplasma der in Längsbalken eingeschlossenen Knorpelzellen färbt sich wie das der hypertrophen Knorpelzellen nicht mit Gallocyanin. Die Zellen in eröffneten Knorpelhöhlen zeigen dagegen nach Färbung mit Gallocyanin eine kräftige Schwärzung des Zelleibes. Die Zahl der PAS-positiven Granula nimmt trotz Einschluß in Knorpelhöhlen mit dem Abstand von der Eröffnungszone

ab. Bei Färbung mit Methylenblau bis zu einem p_H von 3,2 bricht die Basophilie der Interzellularsubstanz in der Eröffnungsfront ab; die in den Markraum hineinragenden Knorpelteile sind ungefärbt. Bei einem p_H von 3,6 werden diese Längsbalken noch angefärbt. Gleichzeitig erscheint die Basophilie bzw. eine schwache Metachromasie des Cytoplasmas der hypertrophen Knorpelzellen, die auch die in Längsbalken eingeschlossenen Knorpelzellen in der Nähe der Eröffnungszone aufweisen. Die Basophilie der Markelemente ist geringer.

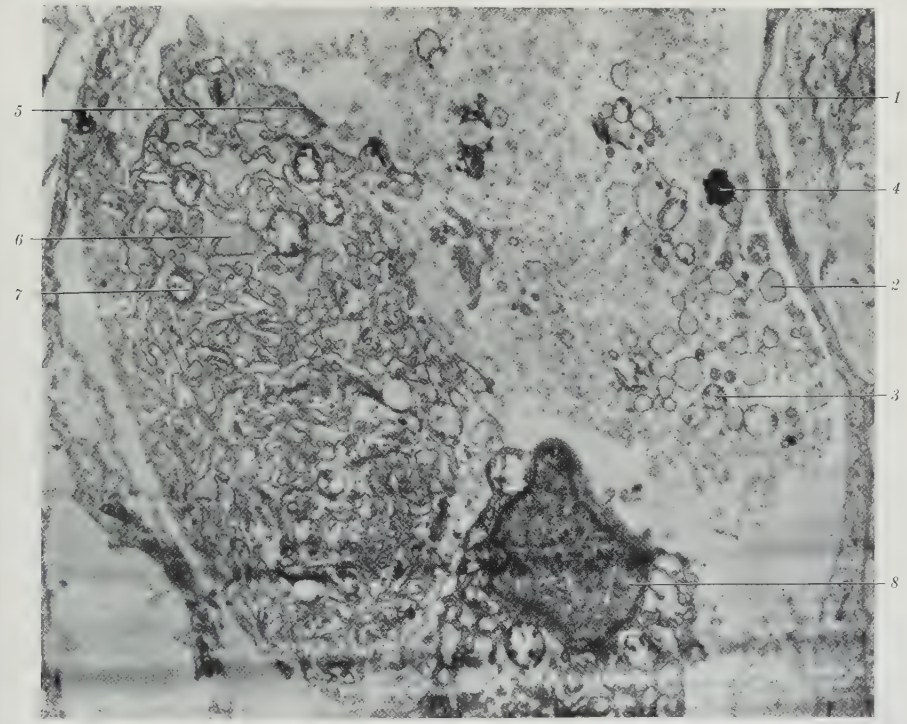


Abb. 28. Zerfallende Zelle: *1* granuläre Grundmasse; *2* Vakuolen (Zisternen?). *3* zerfallende Mitochondrien; *4* osmiophile Einschlüsse; *5* Zellmembran der benachbarten Zelle; *6* erweiterte Zisternen im endoplasmatischen Retikulum; *7* Mitochondrien; *8* Zellkern. Vergr. 5800

Mit den verschiedensten Färbemethoden sind im übrigen keine Ergebnisse zu erheben, die den elektronenmikroskopischen Befunden zur Seite gestellt werden könnten. Unmittelbar in der Eröffnungszone macht sich, wie erwähnt, eine etwas wechselnde Anfärbbarkeit des Cytoplasmas der freien Zellen mit Gallocyanin und Methylenblau in niedrigem p_H bemerkbar, die nach Ribonuclease-Behandlung fehlt. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen 2 Zellformen auf Grund der Cytoplasmastruktur ist nicht möglich, obwohl Färbungsdifferenzen bestehen. Bei Rinderfeten unter 100 mm SSL färben sich die freien Zellen der Eröffnungszone nicht mit PAS. Bei Feten über 100 mm SSL sind in diesen Zellen PAS-positive Granula zu entdecken, die bedeutend kleiner und weniger kräftig gefärbt sind als die Körnchen in hypertrophen Knorpelzellen. Die Anzahl der PAS-positiven Granula in den verschiedenen freien Zellen wechselt.

Diskussion

Unsere elektronenmikroskopischen Erhebungen über die Zellstruktur in der Eröffnungszone sollten das Schicksal der Knorpelzellen nach Eröffnung der

Abb. 29. Gruppe heller Zellen mit elliptischen Zelleinschlüssen: *1* elliptische Einschlüsse mit Detritus; *2* Hauptteil einer hellen Zelle; *3* Fortsatz der hellen Zelle mit langen Mitochondrien, *4* Knorpelkalk, an den sich der Fortsatz der hellen Zelle anschmiegt; *5* Vakuolen in einer Zelle; *6* Fibroblastenkern mit Nukleolen. Vergr. 6600

Knorpelhöhlen klären, da sich lichtmikroskopisch hierüber keine sicheren Aussagen gewinnen lassen. Wir fanden 4 verschiedene Zellarten: 1. Gefäßendothelien, 2. perivaskuläre Fibroblasten, 3. sog. helle und 4. „graue" Zellen. Daneben sind Zellen zu beobachten, die sich nur vermutungsweise in eine dieser Kategorien einordnen lassen.

Die Enden der *Gefäßsprossen* bzw. aus dem Verband herausgelöste Endothelzellen oder begleitende Zellen treten an die Querwände der knorpeligen Interzellularsubstanz heran. Die Fibrillen der Interzellularsubstanz nehmen mit diesen Zellen unmittelbaren Kontakt auf. Nicht nur die Querwände verschwinden, sondern auch die organische Interfibrillärsubstanz, die die Kalkdepots in den Längsbalken umhüllt. Solche nackten Kalkmassen werden dann von allen in der Eröffnungszone auftretenden Zellen umflossen und scheinbar in Vakuolen aufgenommen.

Die *hellen Zellen* schließen sich in ihrer Struktur unmittelbar an die der hypertrophen Knorpelzellen an. Sie können demgemäß als strukturell veränderte Knorpelzellen angesehen werden. In einem zunächst lockeren Grundplasma liegen ein mäßig entwickeltes endoplasmatisches Retikulum, einzelne Mitochondrien und osmiophile Einlagerungen. Die Zellen besitzen einen relativ großen Kern. Es läßt sich eine morphologische Reihe aufstellen, an deren Ende der Markosteoblast steht. Die Metamorphose umfaßt eine stärkere Ausbildung des endoplasmatischen Retikulums und eine Verdichtung des Hyaloplasmas.

Die zweite freie Zellform sind sog. *graue Zellen* mit einem sehr dichten Grundplasma, ohne oder mit nur gering ausgebildetem endoplasmatischem Retikulum. Ihr Kern ist im Vergleich zum Zellkörper sehr klein, besitzt ein dicht verklumptes Chromatin, unter anderem in einer Schicht, die sich der Kernmembran anlegt. Diese in der Eröffnungszone einkernigen Zellen leiten unmittelbar zu *Riesenzellen*

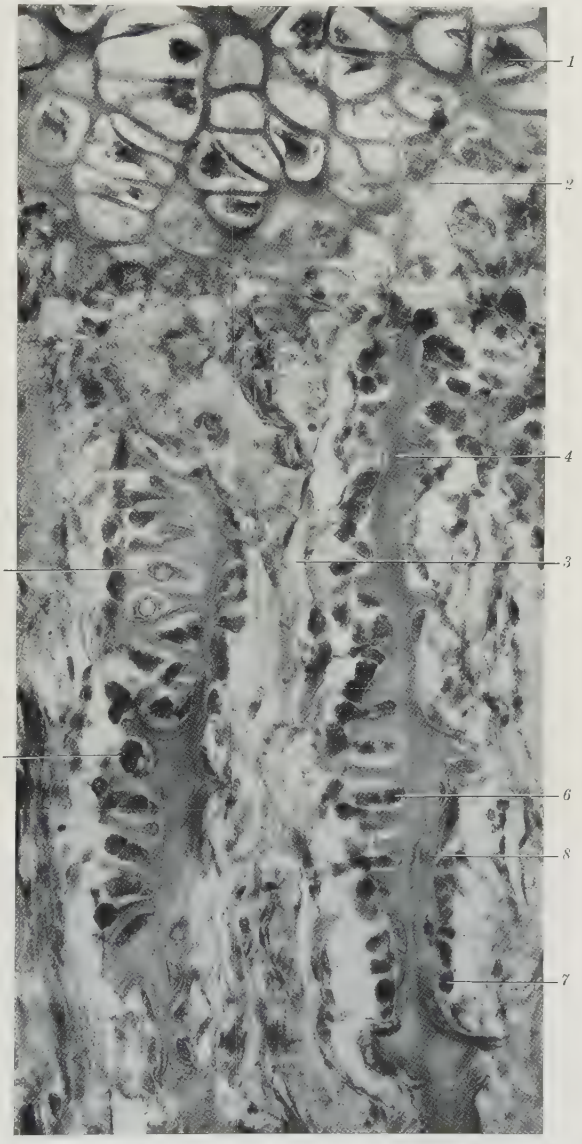


Abb. 30. Eröffnungszone aus dem Metacarpus eines Rinderfetus von 151 mm SSL: *1* Knorpelzellen der Mineralisationszone; *2* Eröffnungszone; *3* Gefäße; *4* Längsbalken von knorpeliger Interzellularsubstanz; *5* noch nicht eröffnete Höhlen; *6* soeben eröffnete Knorpelhöhlen mit noch erhaltenen Querwänden; *7* Osteoblasten; *8* Osteocyten in enchondralem Knochen. Ninhydrin-Schiff-Reaktion. Ob. 40, Ok. 12,5. Photomontage

über, die sich in einem gewissen Abstand von der Eröffnungszone finden. Die Aneinanderlagerung von Zellen, die für eine Entstehung der Riesenzellen durch Zellverschmelzung spricht, wurde beobachtet. In den Riesenzellen ist das endoplasmatische Retikulum mitunter in einem Zellabschnitt stärker ausgeprägt; daneben tritt eine Fülle von Vakuolen auf. Diese Riesenzellen nehmen mit nackten Kalkmassen flächenhaften Kontakt unter Bildung grober Falten (Microvilli ?) auf. Eine strukturelle Auflockerung der Kalkmassen mit Sichtbarwerden einzelner Kalknadeln ist zu beobachten.

Eine Reihe von Kalkeinschlüssen in einfachen oder verwickelt gestalteten Zellvakuolen mit oder ohne Membranumhüllung wurde innerhalb von hellen Zellen beobachtet. Cameron und Robinson (1958) beschrieben in mutmaßlichen Osteoklasten Vakuolen und Anhäufungen von Kristallnadeln. Das von diesen Autoren untersuchte Material von menschlichen Neugeborenen hat postmortale Veränderungen erlitten und ließ sich sehr schwer schneiden. Eine Entscheidung, welcher der von uns in der Eröffnungszone unterschiedenen Zellformen die von Cameron und Robinson geschilderten Zellen entsprechen, ist daher nicht möglich. Bei den von uns beobachteten hellen Zellen mit Kalkeinschlüssen in Vakuolen handelt es sich aber nicht um Riesenzellen.

In Zellen der hellen Reihe treten elliptoide Körper mit einer Membran auf. Ihr Inhalt besteht — abgesehen von einer dichten Matrix — aus Membranpaaren und Bläschen verschiedener Natur. Ähnliche elliptoide Einschlüsse in anderen Zellen enthalten Detritus.

Zerfallende Zellen sind ungewöhnlich selten. Ihr Untergang ist durch eine Auflösung der Zellintegrität unter Erhaltenbleiben der Zellorganellen ausgezeichnet. Es bestehen keine Anhaltspunkte für einen Einschluß von Detritus in anderen Zellen.

Auf Grund unserer elektronenmikroskopischen Befunde kann festgestellt werden: 1. Ein Zerfall von Zellen der Eröffnungszone kommt vor, aber relativ selten. 2. Es läßt sich eine helle Zellreihe aufstellen, die mit den hypertrophen Knorpelzellen beginnt und mit Markosteoblasten endet d. h. die Umwandlung von Knorpelzellen in Markosteoblasten ist wahrscheinlich. Zur Entdifferenzierung in indifferente Stützgewebszellen kommt es offensichtlich nicht. 3. An dem Abbau der organischen Interfibrillärsubstanz des Knorpels sind die verschiedensten Zellformen beteiligt. 4. Der Abbau des Knorpelkalkes erfolgt in einem gewissen Abstand von der Eröffnungszone durch graue Riesenzellen; in hellen Zellen finden sich Vakuolen mit Kalkeinschlüssen, unter anderen in Kernnähe.

Es war uns, wie allen anderen Autoren, nicht möglich, mit färberischen Methoden Befunde zu gewinnen, die sich zu den elektronenmikroskopischen in Parallele setzen lassen. Wir verweisen deswegen auf die Literaturangaben über die enchondrale Osteogenese bei Fell (1925), Weidenreich (1930), Lacroix (1951a, b).

In Knorpelzellen ist seit langem (Lit. bei Schaffer 1930) ein Netzwerk bekannt, das den Kern zirkulär umgibt oder unregelmäßig über den Zelleib verteilt ist; es wurde für ein Chondriom oder einen Binnenapparat gehalten. Im Hinblick auf die Deutung elektronenmikroskopischer Aufnahmen ist bedeutsam, daß diese Strukturen durch Chromsäure (Flemming 1882) bzw. Osmiumsäure (u.a. van der Stricht 1892, Mewes 1910) darzustellen sind. Nach Cajal und Tello (1950) ist das Netzwerk in den hypertrophen Knorpelzellen am stärksten ausgebildet, aber auch in den Zellen der Eröffnungszone vorhanden. Die von den verschiedenen

Autoren wiedergegebenen Bilder zeigen ein Netz, das nach Ausmaß und Verteilung dem endoplasmatischen Retikulum in Knorpelzellen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen entspricht. Die Annahme liegt nahe, daß identische Strukturen vorliegen.

Eine Umwandlung oder *Metamorphose von Knorpelzellen in Osteoblasten* ist zu vermuten, da sich eine morphologische Reihe von den Knorpelzellen über die sog. hellen Zellen zu den Markosteoblasten aufstellen läßt. Für diese Vermutung sprechen auch lichtmikroskopische Beobachtungen am Metacarpus des Rindes. Da im Metacarpus des Rindes nicht alle Knorpelhöhlen in der Eröffnungsfront eröffnet werden, reichen längere Knorpelbalken mit eingeschlossenen Knorpelzellen in die Markhöhle hinein. Die Eröffnung der Knorpelhöhlen erfolgt von den Längsbalken her, so daß zunächst noch die Querbalken erhalten sind. Die Zellen bleiben in den eröffneten Höhlen liegen. Ihr Zellkörper wird kleiner, das Cytoplasma färbt sich mit Gallocyanin dunkel an, der Kern läßt einen größeren Nucleolus erkennen. Damit entsprechen diese Zellen gestaltlich den Markosteoblasten. Wir möchten daher annehmen, daß sich die Knorpelzellen nach Eröffnung ihrer Höhle in Markosteoblasten umgewandelt haben.

Das Schicksal der aus den Knorpelhöhlen befreiten Knorpelzellen wird sehr verschieden beurteilt. Im folgenden werden die erwogenen Möglichkeiten nur skizziert. Eine Umwandlung von Knorpelzellen in Markosteoblasten wurde vermutet (Müller 1858, v. Brunn 1874, Brachet 1893, Hansen 1899, Spuler 1899, Deineka 1916), wie überhaupt enge Beziehungen zwischen Knorpel und Knochen zum Teil als selbstverständlich angesehen wurden (vgl. die sog. Metaplasiefrage, Lit. bei Zawisch 1953, Knese und Biermann 1958, weiterhin die experimentellen Untersuchungen von Fell 1933, Niven 1933). Auf der anderen Seite bezeichnete man als Stammzellen der Markosteoblasten indifferente Markzellen (unter anderen Gegenbaur 1864, Gardner 1956) oder Zellen des Periostbereiches (unter anderen Maximow 1907, Fell 1925, Fell und Robinson 1929). Beide Auffassungen führen zu der weit verbreiteten Meinung, daß die Knorpelzellen in der Mineralisationszone „sterben" (unter anderen Kölliker 1873, Dibbelt 1911, Lacroix 1951), was auch Scott und Pease (1956), Zelander (1959), Takuma (1960) auf Grund elektronenmikroskopischer Aufnahmen annehmen. Diese wechselnden Ansichten über die Herkunft der Osteoblasten hängen zum Teil mit der jeweiligen Auffassung über die Spezifität der verschiedenen Skelettzellen zusammen (Lit. bei Lacroix 1949, 1951; Urist und McLean 1952, McLean und Urist 1955, Bloom 1937, Knese 1956a, 1957; Knese und Biermann 1958). Allerdings wurde bis in die letzte Zeit hinein eine Verbindung zwischen Knorpelzellen und Osteoblasten häufig angezweifelt. Werner (1954, 1955) sieht die Chondrocyten als Stammzellen von Erythrocyten und Leukocyten an.

Die Annahme einer Abkunft der Markosteoblasten von Knorpelzellen führt auch zu einer anderen Beurteilung der Vorgänge im Epiphysenknorpel. Der Gestaltwandel der Knorpelzellen im Epiphysenknorpel wurde zum Teil nur unter dem Gesichtspunkt der Kalkeinlagerung und einer damit im Zusammenhang stehenden Mucopolysaccharidbildung betrachtet (vgl. Knese und Knoop 1961). Auf der anderen Seite haben Streeter (1949), Fell und Robinson (1933), zum Teil auch Fell (1925) den Gestaltwandel der Knorpelzellen als einen Reifungsprozeß angesehen. Dieser Reifungsprozeß würde nach unseren Untersuchungen mit der Metamorphose zu Osteoblasten vorläufig enden (vgl. Knese und Biermann 1958). Der Epiphysenknorpel stellte dann nicht nur einen Platzhalter für den Knochen, sondern auch ein *Zellreservoir für die Osteogenese* dar. Die Einlagerungen von C^{14} (Greulich und Leblond 1953) und von S^{35}-Methionin (Bélanger 1955, 1956, Niklas u. Mitarb. 1956) und S^{35}-Cystin in den Säulen- und hypertrophen Knorpel werden als Zeichen einer Proteinsynthese angesehen. Die hypertrophen Zellen zeichnen sich auch durch Reichtum an PAS-positiven

Granula und Cytoplasmametachromasie aus (vgl. dazu Knese und Knoop 1961). Somit darf man erwägen, ob die Fülle der im hypertrophen Knorpel biochemisch nachweisbaren Stoffe nicht nur mit der Kalkeinlagerung, sondern auch mit einer bevorstehenden Umwandlung der Zellen in Osteoblasten zusammenhängt. Policard (1941) sieht in dieser Stoffspeicherung indessen ein Zeichen der Degeneration. Die Frage bleibt offen, warum die hypertrophen Knorpelzellen und die Zellen in der Eröffnungszone in unseren lichtmikroskopischen Präparaten im allgemeinen als Zelltrümmer erscheinen. Da die obenerwähnten Untersucher die hypertrophen Knorpelzellen als Stapelplatz von Stoffen ansehen, ist daran zu denken, daß es sich hierbei um niedermolekulare Stoffe handelt, die bei der üblichen technischen Behandlung herausgelöst werden. Das gilt wahrscheinlich auch für die elektronenmikroskopische Präparation. Eine starke Schrumpfung der Knorpelzellen bei Wasserentzug hat bereits v. Brunn (1874) beobachtet. Einen Substanzverlust haben Coelho und Chrisman (1960) bei Untersuchungen über die S^{35}-Einlagerung in Knorpelschnitten nachgewiesen.

Ein Rätsel bleibt, warum ein Teil der Zellen zerfällt, und wie diese Trümmer in anderen hellen Zellen aufgenommen werden, da es an entsprechenden Beobachtungen fehlt.

Die *Herkunft der sog. grauen Zellen* ist unklar. Zunächst ist an 2 Quellen zu denken. Einmal könnte es sich um aus dem Verband herausgelöste Endothelzellen oder um Abkömmlinge perivaskulärer Fibroblasten handeln. Es ist allerdings nicht unmöglich, daß eine Verbindung zu den hellen Zellen und damit zu Knorpelzellen besteht. Wir beobachteten Zellen, die ihrer Struktur nach als Übergangsformen zwischen hellen und grauen Zellen angesehen werden könnten. Beachtlich ist allerdings die bei beiden Zellarten verschiedene Kernplasmarelation, die verschieden starke Entwicklung des endoplasmatischen Retikulums und die unterschiedliche Anzahl der Mitochondrien in beiden Zellformen. Auf den Reichtum an Vacuolen und Mitochondrien in Riesenzellen hat bereits Ch'uan (1931) hingewiesen, ebenso auf mononukleäre Osteoklasten. Morphologisch besteht eine größere Ähnlichkeit zwischen Fibroblasten und den sog. grauen Zellen. Es ist daher zu vermuten, daß die grauen Zellen und damit auch die Riesenzellen von Fibroblasten abstammen. Die Entstehung der grauen Zellen im Perichondrium konnten wir elektronenmikroskopisch nicht klären.

Graue Zellen dringen mit den Gefäßsprossen in die Knorpelhöhlen ein. Auf diesen Vorgang ist vielleicht die Tatsache zurückzuführen, daß helle und graue Zellen in der Eröffnungszone häufig paarweise in engen Kontakt der Zellmembranen treten. Takuma (1960) erwähnt ebenfalls die Anlagerung von Bindegewebszellen an Knorpelzellen der Eröffnungszone. Der Strukturwandel der grauen Zellen mit zunehmendem Abstand von der Eröffnungszone macht wahrscheinlich, daß sie in loco entstehen. Er besteht in einer Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums und der Vakuolen sowie dem Verschmelzen mehrerer Zellen zu Riesenzellen. Ob diese Zellen den Makrophagen von Weinmann und Sicher (1955) entsprechen, ist fraglich. Das Auftreten von Riesenzellen in einem gewissen Abstand von der Eröffnungszone ist seit langem bekannt (Kölliker 1873, Zawisch 1931, Dodds 1932, Knese 1957).

In den von uns beobachteten *Riesenzellen* sind im allgemeinen mehrere Abschnitte elektronenmikroskopisch zu unterscheiden. Unmittelbar in der Nachbar-

schaft nackter Kalkmassen besitzt das Cytoplasma eine feingranuläre bzw. fast homogene Struktur. Die Zelloberfläche ist grob gebuchtet; mitunter läßt sie eine Zellmembran vermissen. Darauf folgt eine Zellzone, die durch Vakuolen und Mitochondrien ausgezeichnet ist. In dem kalkfernen Teil der Zelle treten zu den Mitochondrien noch Membranen des endoplasmatischen Retikulums hinzu.

Diese Beobachtungen sprechen eindeutig für die Mitwirkung der Riesenzellen bei der Beseitigung des Knorpelkalkes. Scott und Pease (1956) meinen allerdings auf Grund der gleichen Beobachtung, der Kalk gehöre dem Knochengewebe an. Da die Autoren aber keine Kollagenfasern sehen konnten, glauben sie, diese seien zuvor aufgelöst worden. Die von Scott und Pease (1956) vorgelegte Abbildung, noch besser die gleiche Abbildung in der Wiedergabe bei Putschar (1960), läßt aber erkennen, daß die Kalkmassen ihrer Struktur nach (vgl. Knese 1959, Zelander 1959) Knorpelkalk und nicht Knochenkalk sind. Dodds (1932) hat bereits die Resorption der verkalkten Längsbalken durch Riesenzellen, der Querwände aber durch kleine Zellen beschrieben. Schließlich beobachteten Benoit und Clavert (1947) bei Enten nach Entfernung der Parathyreoidea und anschließender Verabreichung von Follikulin sowie nach kalkarmer Ernährung die Bildung von Knochenbälkchen ohne Kalkablagerung; an diesen kalklosen Bälkchen treten im Gegensatz zu den kalkhaltigen keine Osteoklasten auf. Hancox (1956) kommt auf Grund der vorliegenden Literatur zu der Feststellung, daß die Osteoklasten auf die Knochensalze wirken; Befunde, die für eine Auflösung des Kollagens sprechen, wurden bisher nicht mitgeteilt. Lipp (1959) wies aber eine Aminopeptidase-Aktivität der Osteoklasten nach, Osteozyten verhalten sich dagegen sehr unterschiedlich. Nach zytochemischen und autoradiographischen (S^{35}-)Untersuchungen von Tonna (1960) enthalten Osteoklasten Sulfo-Mukopolysaccharide; H^3-Thymidin wird in Riesenzellen nicht eingebaut, d.h. es findet in Osteoklasten keine Synthese von DNS statt.

In der sehr umfangreichen Literatur (vgl. Arey 1920, Haythorn 1929, Jaffe 1930, Zawisch 1931, Hancox 1949, 1956) wird die Verteilung der Riesenzellen im Skelett kaum berücksichtigt (unter anderen Koelliker 1873, Mair 1929, Barnicot 1947, Gardner 1956, Tonna 1960). Koelliker (1873) hat die Resorptionsflächen an Extremitätenknochen abgebildet (vgl. freie chondrale Flächen: Knese 1957, Bahling 1958). Hier treten bekanntlich chondrale Knochenbälkchen mit dem Periost in Verbindung und kommen regelmäßig Riesenzellen wie an allen anderen Orten mit chondralem Knochen vor. Die freien chondralen Flächen entsprechen der Lage nach der von Leblond u. Mitarb. (1951) beschriebenen Trichterregion, die durch Einverleibung enchondraler Balken in den Schaft entsteht. Damit ist die Annahme widerlegt, daß es sich hier um Resorptionsflächen handele. Das Auftreten von Riesenzellen im Zusammenhang mit der Entfernung des Knorpelkalkes wäre dann leicht verständlich. Es stünde im Einklang mit den bisherigen elektronenmikroskopischen Beobachtungen über die Riesenzellen.

Die jenseits der Eröffnungszone auftretenden Riesenzellen stehen wohl mit der Resorption des nackten *Knorpelkalkes* in Verbindung. Die Kalknadeln in Nähe der Riesenzellen sind länger (240 Å) als die Nadeln des präossalen Gewebes (184,5 Å, Knese und Knoop 1958), aber kürzer als die des hypertrophen Knor-

pels (390 Å)[1]. In der Dicke entsprechen diese Nadeln (24 Å) etwa denen des hypertrophen Knorpels (20 Å); sie sind bedeutend dünner als die im präossalen Gewebe (54 Å)[2]. Zur Zeit liegen keine Beobachtungen über eine Resorption von Knochengewebe in der Eröffnungszone durch Riesenzellen vor. Die Möglichkeit, daß Riesenzellen sich an anderen Orten unter Umständen abweichend verhalten, ist wahrscheinlich, braucht aber in diesem Zusammenhang nicht diskutiert zu werden (vgl. auch Putschar 1960).

Der *Mechanismus der mutmaßlichen Kalkresorption* ist elektronenmikroskopisch nicht zu erkennen. Da über die Tätigkeit der Riesenzellen keine Klarheit besteht, vermeidet Dodds (1932) die Bezeichnung „resorption" und spricht von „removal" oder „destruction". Die Annahme eines enzymatischen Vorgangs legen elektronenmikroskopische Befunde nahe, da die Riesenzellen eine Fülle von Mitochondrien enthalten (s. auch Scott und Pease 1956). Es sei daran erinnert, daß bei den Lösungsmitteln für die Kalksalze an Stoffe gedacht wurde, die den chelating agents, nämlich der Äthylendiamintetraessigsäure, entsprechen (McLean 1954, 1957; McLean und Urist 1955). Bei Beurteilung der Leistung der Riesenzellen ist auch zu berücksichtigen, daß die Kalkmassen im Resorptionsgebiet auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen nackt, d. h. frei von umhüllenden organischen Komponenten erscheinen. Das weitere Schicksal der Riesenzellen konnten wir nicht klären.

Unsere elektronenmikroskopischen Befunde sprechen dafür, daß an der Resorption der organischen Interzellularsubstanz des Knorpels in der Eröffnungszone sowohl Gefäßendothelien bzw. fibroblastenähnliche Elemente als auch graue einkernige Zellen beteiligt sind. Das Verschwinden der Querwände ohne Gegenwart von Riesenzellen unter dem Einfluß sog. kleiner Zellen haben bereits Dodds (1932) und Brachet (1893) beschrieben. Auch über diesen Prozeß lassen unsere elektronenmikroskopischen Bilder keine Aussagen zu. Es ist möglich, daß auf diesem Wege vom Knorpel gebildete Substanzen, z. B. Chondroitinschwefelsäure, wie verschiedentlich erwogen (Siffert 1951, Godard 1951, Neumann u. Mitarb. 1952, Dziewiatkowski 1951, 1952, 1954, 1958, Davies und Young 1954, Bélanger 1954, Amprino 1955), nunmehr für die Osteogenese zur Verfügung stehen.

Unsere Untersuchungen sollten klären, ob die hypertrophen Knorpelzellen degenerierende Zellen sind, die nach Eröffnung der Knorpelhöhlen absterben. Angesichts dieser Fragestellung konnte auf eine Diskussion der umfangreichen Literatur über die enchondrale Osteogenese verzichtet werden. Ein Zellzerfall erfolgt nur in beschränktem Umfange, wobei die Struktur der Zellorganellen zunächst erhalten bleibt. Der größere Teil der Knorpelzellen macht dagegen eine Metamorphose zu Markosteoblasten durch. Daneben treten in der Eröffnungszone graue Zellen auf, die möglicherweise Abkömmlinge der Gefäßendothelien oder perivasculären Fibroblasten sind. In einem gewissen Abstand von der Eröffnungszone entstehen durch Zellverschmelzung aus den grauen Zellen

[1] Grenzwerte (s. S. 4) in Nähe Riesenzellen: 131/441 Å; im hypertrophen Knorpel: 248/641 Å; im präossalen Gewebe: 93/368 Å. Für die Größe der Kristalle im Knorpel werden folgende Werte angegeben: Robinson und Cameron (1956) Länge 250—750 Å, Dicke 50 bis 75 Å, Scott und Pease (1956) 400–500 Å bzw. 50 Å, Durning (1958) 220—1000 Å und 35 bis 60 Å, Takuma (1956) 200—800 Å, Länge und Dicke unter 50 Å.

[2] Grenzwerte Nähe Riesenzellen: 13/45 Å, hypertropher Knorpel: 12/35 Å, präossales Gewebe: 39/77 Å.

Riesenzellen. Die Riesenzellen spielen offensichtlich bei der Beseitigung des nackten Knorpelkalkes eine Rolle. Ein Einschluß von Knorpelkalk erfolgt auch in Vakuolen der hellen Zellen.

Zusammenfassung

1. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Eröffnungszone des Epiphysenknorpels der Tibia von Rattenfeten führte zur Unterscheidung von 4 Zellformen: Gefäßendothelien, perivaskulären Fibroblasten, sog hellen und grauen Zellen.

2. Gefäßendothelien, sie begleitende Fibroblasten und graue Zellen dringen durch die Querwände des Knorpels in Knorpelhöhlen ein. Hierbei verschwindet nicht nur die organische Interfibrillärsubstanz der Querwände, sondern auch die der Längswände, so daß der Knorpelkalk nackt zutage liegt. Sämtliche Zellen schließen zunächst Knorpelkalk in einer Art von vakuolären Räumen ein.

3. Ein kleiner Teil der aus den Höhlen befreiten Knorpelzellen zerfällt, wobei die Struktur der Zellorganellen zunächst erhalten bleibt. Diese Zellorganellen werden vermutlich in der Folge von anderen Zellen aufgenommen, die Vakuolen mit Detritus enthalten.

4. Der größere Teil der Knorpelzellen bildet in Form der sog hellen Zellen den Anfang einer morphologischen Reihe, die zum Markosteoblasten führt. Während dieser Metamorphose wächst die Anzahl der Membranen des endoplasmatischen Retikulums, das Grundplasma wird dichter. Die Zahl der Mitochondrien in den hellen Zellen ist größer als die der hypertrophen Knorpelzellen. Weiterhin treten in den hellen Zellen osmiophile Einschlüsse auf, die in den hypertrophen Knorpelzellen selten sind. Der Kern der hellen Zellen ist relativ groß.

5. In der Eröffnungsfront entstehen die sog. grauen Zellen, vielleicht aus Gefäßendothelien oder perivaskulären Fibroblasten. Ihr Cytoplasma ist sehr dicht; mitunter besitzt es reichlich größere Granula. Die Anzahl der Mitochondrien in diesen Zellen ist beachtlich. Der Kern der grauen Zellen ist im Vergleich zum Cytoplasma relativ klein. Er besitzt ein verklumptes Chromatin, das unter anderem der Kernmembran in einer dicken Schicht anliegt. Die grauen Zellen treten häufig paarweise mit den hellen Zellen in engem Kontakt der Zellmembranen auf.

6. Aus den einkernigen grauen Zellen werden in einigem Abstand von der Eröffnungszone, wahrscheinlich durch Zellverschmelzung, Riesenzellen. Ihr Grundplasma behält eine dichte körnige Struktur bei, auch die große Anzahl der Mitochondrien bleibt erhalten. Außerdem treten Membranen des endoplasmatischen Retikulums und viele Vakuolen auf. Die Riesenzellen legen sich den nackten Kalkmassen mit einer Fläche an und entwickeln hier grobe Buchten. Das an die Buchten anschließende Grundplasma erscheint homogen. Die Kalkmassen zeigen eine aufgelockerte Struktur. Das weitere Schicksal der Kalknadeln und der Riesenzellen konnte nicht verfolgt werden.

7. In einer Reihe von hellen Zellen wurden zum Teil im Golgifeld, zum Teil in unmittelbarer Nähe des Kernes Vakuolen mit morphologisch unveränderten Kalkmassen nachgewiesen.

8. Der Epiphysenknorpel stellt nach unseren Untersuchungen auch ein Zellreservoir dar, da sich die Knorpelzellen nach Eröffnung der Höhlen in Markosteoblasten umwandeln.

Literatur

Amprino, R.: Autoradiographic research on the S^{35}-sulphate metabolism in cartilage and bone differentiation and growth. Acta anat. (Basel) **24**, 121—163 (1955).

Arey, L. B.: The origin, growth and fate of osteoclasts and their relation to bone resorption. Amer. J. Anat. **26**, 315—337 (1920).

Bahling, G.: Die Entwicklung des Querschnittes der großen Extremitätenknochen bis zum Säuglingsalter. Morph. Jb. **99**, 109—188 (1958).

Barnicot, N. A.: The supravital staining of osteoclasts with neutral-red: their distribution on the parietal bone of normal growing mice, and a comparison with the mutants grey-lethal and hydrocephalus-3. Proc. roy. Soc., Ser. B **134**, 467—485 (1947).

Bélanger, L. F.: Autoradiographic visualization of the entry and transit of S^{35} in cartilage, bone, and dentine of young rats and the effect of hyaluronidase in vitro. Canad. J. Biochem. **32**, 161—169 (1954).

— Autoradiographic visualization of Ca^{45} intake by normal and pathological cartilage in vitro. Soc. exp. Biol. Med. **88**, 150—152 (1955).

— Autoradiographic studies of the formation of the organic matrix of cartilage, bone and the tissues of teeth. In Ciba Found. Symposion on bone structure and metabolism. London Churchill 1956.

Benoit, J., et Clavert: Comportement des ostéoclastes vis-à-vis de travers osseuses non calcifiées, chez le canard domestique. C. R. Soc. Biol. (Paris) **141**, 911—912 (1947).

Bloom, W.: Cellular differentiation and tissue culture. Physiol. Rev. **17**, 589—617 (1937).

Brachet, A.: Etude sur la résorption du cartilage et de développement des os longes chez les oiseaux. Monthly int. J. Anat. and Physiol. **10**, 391—417 (1893).

Brunn, A. v.: Beiträge zur Ossifikationslehre. Arch. Anat. u. Physiol. 1—17 (1874).

Cajal, S. R., e F. J. Tello y Munoz: Elementos de histologia normal y de téchnica micrografica, XIII. edic., Madrid 1950.

Cameron, D. A., and R. A. Robinson: The presence of crystalls in the cytoplasm of large cells adjacent to sites of bone absorption. J. Bone Jt Surg. A **40**, 414—418 (1958).

Ch'uan, Ch. H.: Mitochondria in osteoclasts. Anat. Rec. **49**, 397—399 (1931).

Coelho, R. R., and O. D. Chrisman: Sulphate metabolism in cartilage. II. S^{35}-sulphate uptake and total sulphate in cartilage slices. J. Bone Jt Surg. A **42**, 165—172 (1960).

Davies, D. V., and L. Young: The distribution of radioactive sulphur (S^{35}) in the fibrous tissues, cartilages and bones of the rat following its administration in the form of inorganic sulphate. J. Anat. (Lond.) **88**, 174—183 (1954).

Deineka, D.: Die Entwicklung der Knochenzellen im perichondralen Prozeß. Anat. Anz. **46**, 97—126 (1914).

Dibbelt, W.: Beiträge zur Histogenese des Skelettgewebes und ihren Störungen. Beitr. path. Anat. **50**, 411—436 (1911).

Dodds, G. S.: Osteoclasts and cartilage removal in endochondral ossification of certain mammals. Amer. J. Anat. **50**, 97—127 (1932).

Durning, W. C.: Submicroscopic structure of frozendried epiphyseal plate and adjacent spongiosa of the rat. J. ultrastruct. Res. **2**, 245—260 (1958).

Dziewiatkowski, D. D.: Radioautographic visualization of sulfur-35 disposition in the articular cartilage and bone of suckling rats following injection of labelled sodium sulfate. J. exp. Med. **93**, 451—458 (1951).

— Radioautographic studies of sulfate-sulfur (S^{35}) metabolism in the articular cartilage and bone of suckling rats. J. exp. Med. **95**, 489—496 (1952).

— Effect of age on some aspects of sulfate metabolism in the rat. J. exp. Med. **99**, 283—298 (1954).

— Autoradiographic studies with S^{35}-sulfate. Rev. Cytol. **7**, 159—194 (1958).

Fell, H. B.: The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. J. Morph. **403**, 417—459 (1925).

— Chondrogenesis in cultures of endosteum. Proc. roy. Soc. B **112**, 417—427 (1933).

—, and R. Robinson: The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. Biochem. J. **23**, 767—784 (1929).

— — Glycogen in cartilage. Nature (Lond.) **131**, 62 (1933).

Flemming, W.: Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung. Leipzig 1882 (nach Schaffer 1930).
Gegenbaur, C.: Über die Bildung des Knochengewebes, I u. II. Jena. Z. Naturwiss. **1**, 343—369 (1864); **3**, 206—246 (1867).
Gardner, E.: Osteogenesis in the human embryo and fetus. The biochemistry und and physiology of bone. Ed. by G. H. Bourne, p. 359—397. 1956.
Godard, H.: L'os de croissance épiphysaire et les mucopolysaccharides. Arch. Anat. micr. **40**, 223—245 (1951).
Greulich, R. C., and C. P. Leblond: Radioautographic visualization of radiocarbon in the organs and tissues of newborn rats following administration of C^{14}-labelled bicarbonate. Anat. Rec. **115**, 559—585 (1953).
Hancox, N.: The osteoclast. The biochemistry and physiology of bone. Edit. by G. H. Bourne, p. 213—247. 1956.
Hancox, N. M.: The osteoclast. Biol. Rev. **24**, 448—471 (1949).
Hansen, C. C.: Über die Genese einiger Bindegewebsgrundsubstanzen. Anat. Anz. **16**, 417—438 (1899).
Haythorn, S. R.: Multinucleated giant cells. Arch. Path. (Chicago) **7**, 651—713 (1929).
Jaffe, H. L.: The resorption of bone. A consideration of the underlying processes particularly in pathologic conditions. Arch. Surg. (Chicago) **20**, 355—385 (1930).
Knese, K.-H.: Periostale Osteogenese und Bildung der Knochenstruktur bis zum Säuglingsalter. Z. Zellforsch. **44**, 585—643 (1956a).
— Knochenbildung und Knochenaufbau unter Berücksichtigung der Histopathologie. Regensburg. Jb. ärztl. Fortbild. **5**, 177—189 (1956b).
— Die diaphysäre chondrale Osteogenese bis zur Geburt. Z. Zellforsch. **47**, 80—113 (1957).
— Knochenstruktur als Verbundbau, Versuch einer technischen Deutung der Materialstruktur des Knochens. Zwanglose Abhandlungen aus dem Gebiet der normalen und pathologischen Anatonie, herausgeg. von W. Bargmann u. W. Doerr, Heft 4. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
— Die Ultrastruktur des Knochengewebes. Dtsch. med. Wschr. **84**, 1640—1644 (1959).
— The ultra-structure of bone. Germ. med. Monthly **4**, 427—431 (1959).
—, u. H. Biermann: Die Knochenbildung an Sehnen- und Bandansätzen im Bereich ursprünglich chondraler Apophysen. Z. Zellforsch. **49**, 142—187 (1958).
—, u. A. Knoop: Elektronenoptische Untersuchungen über die periostale Osteogenese. Z. Zellforsch. **48**, 455—478 (1958).
— — Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen am Knorpelgewebe über den Ort der Bildung des Mucopolysaccharid-Protein-Komplexes. Z. Zellforsch. **52**, 201—258 (1961).
—, u. G. Thews: Zur Beurteilung graphisch formulierter Häufigkeitsverteilungen bei biologischen Objekten. Biometr. Z. **2**, 183—193 (1960).
Kölliker, A.: Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen. Leipzig 1873.
Lacroix, P.: L'organisation des os. Liège: Desoer 1949.
— The organization of bones. London: Churchill 1951a.
— L'os et les mécanismes de sa formation. J. Physiol. (Paris) **43**, 386—424 (1951b).
Leblond, C. Pl., G. W. Wilkinson, L. F. Bélanger and J. Robichon: Radio-autographic visualization of bone formation in the rat. Amer. J. Anat. **86**, 289—341 (1950).
Lipp, W.: Aminopeptidase in bone cells. J. Histochem. Cytochem. **7**, 205 (1959).
McLean, F. C.: Biochemical and biomechanical aspects of the resorption of bone. J. Periodont. **25**, 176—182 (1954).
— The parathyroid hormone and bone. Clin. Orthop. **9**, 46—60 (1957).
—, and M. R. Urist: Bone; an introduction to the physiology of skeletal tissue. Chicago: University Chicago Press 1955.
Mair, R.: Untersuchungen über das Wachstum der Schädelknochen. Z. Anat. **90**, 293—342 (1929).
Maximow, A.: Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. III. Die embryonale Histogenese des Knochenmarks der Säugetiere. Arch. mikr. Anat. **76**, 1—113 (1910/11).
Mewes, F.: Über Strukturen in den Zellen des embryonalen Stützgewebes sowie über die Entstehung der Bindegewebsfibrillen, insbesondere derjenigen der Sehnen. Arch. mikr. Anat. **75**, 149—208 (1910).

Müller, H.: Über die Entwicklung der Knochensubstanz nebst Bemerkungen über den Bau rachitischer Knochen. Z. wiss. Zool. **9**, 147—233 (1858).

Niklas, A., u. W. Oehlert: Autoradiographische Untersuchung der Größe des Eiweißstoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. Beitr. path. Anat. **116**, 92—123 (1956).

Niven, J. S. F.: The development in vivo and in vitro of the avian patella. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **128**, 480—501 (1933).

Policard, A.: L'appareil de croissance des os longs; ses méchanismes à l'état normal et pathologique. Paris: Masson & Cie. 1941.

Putschar, W. G.: General pathology of the musculo-skeletal system. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. III/2, S. 364—488. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Robinson, R. A., and D. A. Cameron: Electron microscopy of cartilage and bone matrix at the distal epiphyseal line of the femur in the newborn infant. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 253—260 (1956).

Schaffer, J.: Die Stützgewebe. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. II/2, S. 1—390. 1930.

Scott, B. L., and D. Pease: Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. Anat. Rec. **126**, 465—495 (1956).

Siffert, R. S.: The rôle of alkaline phosphatase in osteogenesis. J. exp. Med. **93**, 415—426 (1951).

Spuler, A.: Beiträge zur Histogenese des Mesenchyms. Verh. Anat. Ges. 13. Verslg, Anat. Anz. **16**, Erg.h. 13—16 (1899).

Streeter, G. L.: Developmental horizons in human embryos (fourth issue). A review of the histogenesis of cartilage and bone. Contr. Embryol. Carneg. Inst. **33**, 149—168 (1949).

Stricht, O. van der: Contribution a l'étude de la sphère attractive. Bull. Acad. Méd. Belg. **3**, 182—187 (1892).

Tonna, E. A.: Osteoclasts and the aging skeleton; a cytological, cytochemical and autoradiographic study. Anat. Rec. **137**, 251—269 (1960).

Urist, M. R., and F. C. McLean: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants of the anterior chamber of the eye. J. Bone Jt Surg. A **34**, 443—476 (1952).

Weidenreich, F.: Das Knochengewebe. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. II/3, S. 391—520. 1930.

Werner, H.: Ursprüngliche Osteocyten als Stammzellen für Erythrocyten und Plasmazellen, Fortentwicklung in Säulenknorpelzellen zu Polykaryocyten und Stammzellen der leukozytären Reihe. Folia haemat. (Lp-.) **73**, 136—158 (1955).

— Das Schicksal der Zellen des Säulenknorpels im Sternalmark der weißen Ratte. Z. mikr.-anat. Forsch. **60**, 573—588 (1954).

Zawisch, C.: Historischkritisches und Neues zur Frage der Osteoklasten, ihrer Entstehung und der Resorption im Knochen. Z. mikr.-anat. Forsch. **27**, 106—210 (1931).

— Die frühe Histogenese der menschlichen Clavicula. Z. mikr.-anat. Forsch. **59**, 187—226 (1952).

Zelander, T.: Ultrastructure of articular cartilage. Z. Zellforsch. **49**, 720—738 (1959).

Prof. Dr. Karl-Heinrich Knese,
Elektronenmikroskopische Abteilung des Anatomischen Instituts der Universität Kiel,
Neue Universität, Eingang F 1

Zeitschrift für Zellforschung 54, 39—67 (1961)

From the 2nd Surgical Division, Kyoto University Medical School, Kyoto, Japan
(Director: Prof. Dr. Yasumasa Aoyagi)

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY ON WALLERIAN DEGENERATION OF THE PERIPHERAL NERVE

By

Susumu Ohmi*

With 37 Figures in the Text

(Received October 7, 1960)

Since the first description by Waller (1852), many investigators studied Wallerian degeneration of the peripheral nerve with various methods (Bethe 1903, Cajal 1928, Spielmeyer 1929, Holmes and Young 1942, Novack and Montega 1952, Takeuchi 1957). With respect to details of the histological changes, however, their comments are not always in good agreement, and the mechanisms which lead to the changes are still obscure. In addition, the normal structure of myelinated nerve fiber as revealed by the recent electron microscopic studies (Geren 1954, Fernendez-Morán and Finean 1957, Robertson 1955 to 1958) differs considerably from that described in the light microscopic studies (Cajal 1928, Holmes and Young 1942). Therefore it can be expected that some of the histological views on Wallerian degeneration must be corrected.

Electron microscopic study is considered to be the most effective method for the re-examination of Wallerian degeneration, since in such investigations axon, myelin sheath and Schwann-cell cytoplasm can be observed simultaneously with the high resolving power of the electron microscope.

The present article reports on the electron microscopic findings in Wallerian degeneration of the rabbit's sciatic nerve, especially of its myelinated fibers.

Materials and methods

The materials for this study were obtained from 16 rabbits, weighing between 1.5—2.0 kg. A piece of sciatic nerve stump, about 1 cm in length, was removed at the level of the ischial tuberosity and a gap, about 2—3 cm in distance, was left between the cut ends in order to prevent reinnervation.

From 24 hours to 55 days after the initial operation, the proximal part of 4 cm in length of the peripheral nerve stumps was bound to a glass stick and excised with the stick, and immediately immersed in a 1% phosphate-buffered osmic acid (pH 7.2), for 4 to 16 hours in the refrigerator. After dehydration in alcohol and immersion in a mixture of 6 to 4 parts of n-buthyl and methylmethacrylate for 1 hour, about 1 cm of the middle portion was dissected into segments at intervals of less than 2 mm. These segments were successively immersed in methacrylate mixture and then embedded.

Ultrathin sections, cut with the Shimadzu microtome, were examined in the electron microscope, Hitachi HU 10 model and Akashi Tronscope TRS-50 E-type. The micrographs were taken at an original magnification of 2,500 to 10,000×.

This study is based on the observations of degenerated peripheral nerve stumps which were excised about 1.5—2.5 cm distal to the initially cut end, so that the traumatic degeneration (Ranson 1912, Bucy 1928) can be excluded.

* The author wishes to express the acknowledgement to Assist. Prof. Dr. Ch. Kimura of our clinic for his constant help throughout this study, to Assist. Prof. Dr. M. Nishiura and the members of Leprosy Research Laboratory of Kyoto University, for their useful discussions and kindly assistance in carrying out the experiments.

For light microscopy, another piece of each peripheral stump was removed. These pieces were fixed in osmic acid and examined after hematoxylin staining for comparison with the electron microscopic findings.

Observations

Normal structure of myelinated nerve fiber. A myelinated fiber consists of the axon, the myelin sheath and the Schwann-cell (S-cell) cytoplasm (Fig. 1). Inside the axon, a few mitochondria, endoplasmic reticulum and many axonfilaments, about 90 Å in diameter, can be seen in the axoplasm (PALADE 1955, THONBURG and DE ROBERTIS 1956) (Fig. 3). The myelin sheath is composed of the compact myelin lamellae formed by the alternating dense and light layers (FERNANDEZ-MORÁN and FINEAN 1957) (Fig. 12); the outermost layer of the lamellae is connected with the surface (or plasma) membrane of S-cell by the mesaxon (GEREN 1954, ROBERTSON 1957) (Fig. 1 and 12); the innermost layer is the thin S-cell cytoplasm layer (ROBERTSON 1958a, b). The axon-Schwann membrane consists of the innermost Schwann membrane, the axolemma and the gap lying between both membranes (ROBERTSON 1957). The S-cell surface membrane is closely covered with the basement membrane (GEREN 1957), which forms a very thin, continuous envelope round the nerve fiber. The latter membrane is separated from the interstitial space by the neurilemmal collagen fibrils disposed in loose bundles.

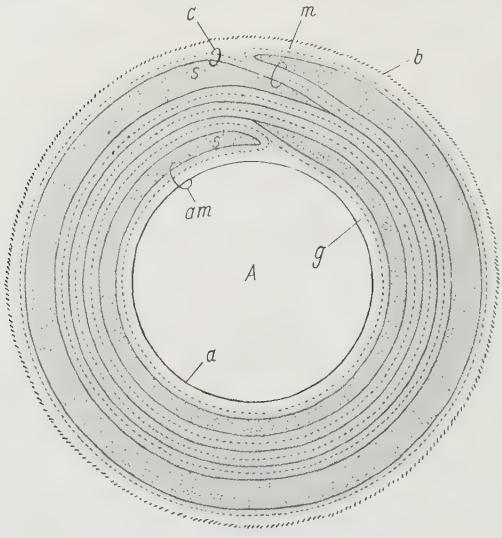


Fig. 1. Illustration of cross section of a normal myelinated nerve fiber. The dense line shows the dense layer of the myelin lamella, the dotted line the intermediate line. The light layer of the lamella is represented as the space lying between both lines. *A* axon, *a* axolemma, *am* axon-Schwann membrane, *g* gap, *s* S-cell cytoplasm, *s'* innermost S-cell cytoplasm, *m* mesaxon, *c* S-cell surface (or plasma) membrane, *b* basement membrane. [The author referred to the illustrations shown by ROBERTSON (1958a, b)]

In this paper, nerve fibers were divided into three groups, following ABERCROMBIE and JOHNSON (1946b): (1) small fibers (smaller than 4 μ in diameter), (2) medium (4—9 μ) and (3) large fibers (larger than 9 μ). There are, however, no strict boundaries among these groups.

Changes of axon. 24 hours after nerve section, no significant changes appeared inside the axons of most fibers. In some fibers, however, the mitochondria and the endoplasmic reticulum began to degenerate (Fig. 4).

After 48 hours, mitochondria swelled into vesicles, or showed a granulated and condensed matrix, in all axons. The endoplasmic reticulum underwent the same changes (Fig. 5). In some axons, the axonfilaments disintegrated into fragments. As indicated by YOUNG (1945), the cylindrical shape of normal axons began to produce fusiform swellings, which were connected with each other by narrow strands of the denser axoplasm. This change, which was probably caused by

a surface tension of the axoplasm (Young 1945), progressed more rapidly in the smaller fibers. In the narrow portions of axons, the axonfilaments tended to be winding.

After 72 hours, the axonfilaments all broke down into short, more or less spiral fragments. The fragments got intertwined and gradually agglomerated. The

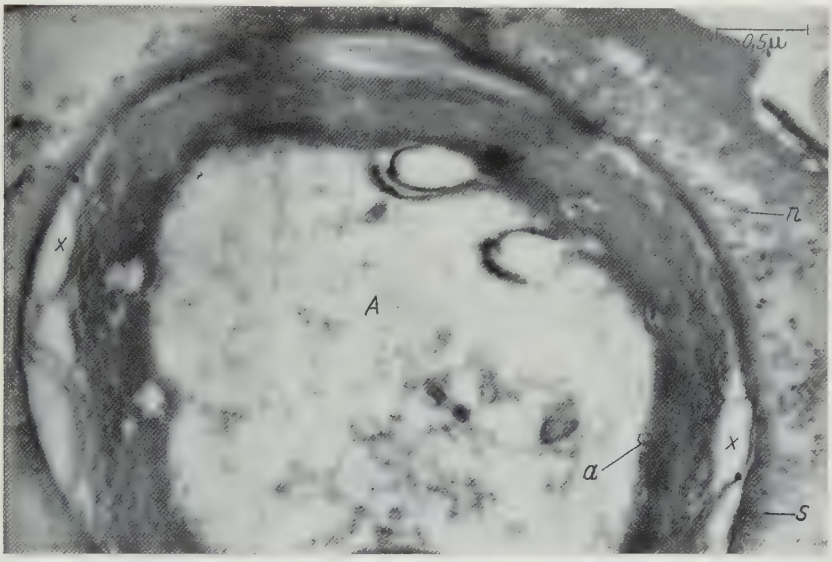


Fig. 2. Part of a cross section through a normal myelinated nerve fiber. × artificial exfoliation of myelin lamellae, *a* axon-Schwann membrane, *A* axon, *n* neurilemmal collagen fibrils, *s* S-cell cytoplasm. × 23900

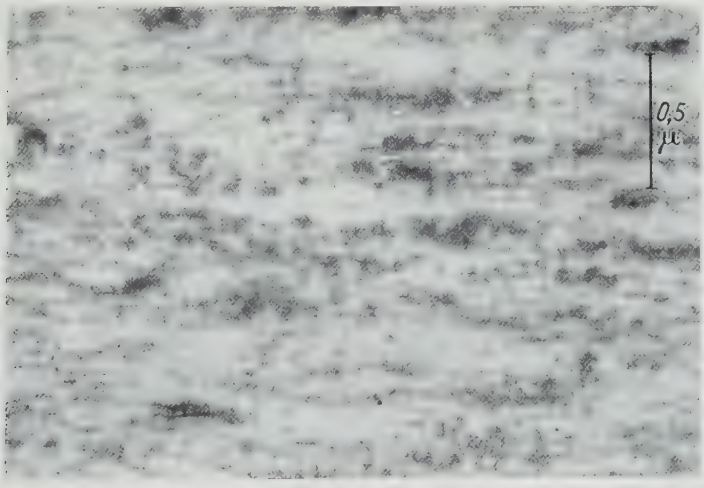


Fig. 3. Many axonfilaments are seen inside of a normal axon. × 35000

axoplasm became homogeneous and less electron-dense with increase of the axon-diameter (Fig. 6 and 7). The axons of the small fibers were completely broken up into segments.

After 96 hours, all axons were filled with a light liquid and with the agglomerates of axonfilament-fragments (Fig. 11). Segmentations of the axon took place

in the medium fibers, whereas in the large this change did not appear until 6 days after the nerve section.

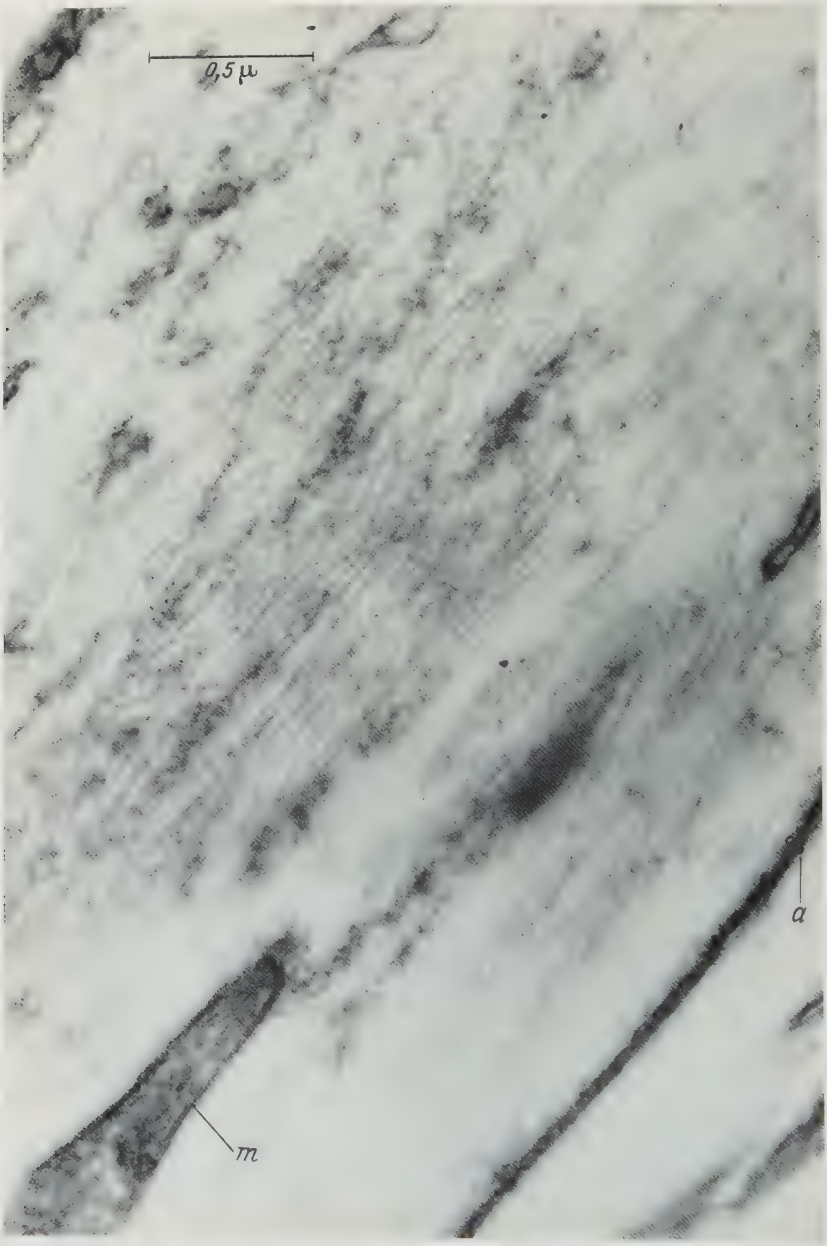


Fig. 4. Longitudinal section of an axon, 24 hours after nerve section. Inside a mitochondrion (*m*), granules can be seen. Axonfilaments and the axoplasm are still intact. *a* axon-Schwann membrane. × 44000

Afterwards the axonfilament-fragments and other degenerated formations decreased their density very slowly, and they disappeared together with the

surrounding myelin lamellae. In extremely large-sized fibers, some of axon remnants could still be found as late as 44 days after the nerve section (Fig. 21).

Changes of myelin sheath. 24 hours after nerve section, no significant change was found in the myelin sheath. There were only, in the smaller fibers, retractions of the myelin lamellae from the nodes of RANVIER.

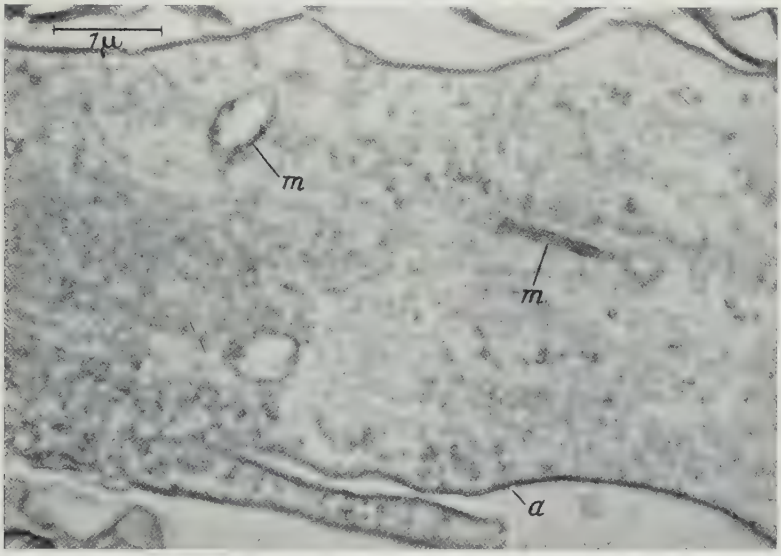


Fig. 5. Axon, 48 hours after nerve section. The scattered small vesicles are degenerated endoplasmic reticulum. *m* degenerated mitochondrion, *a* axon-Schwann membrane. ×14300

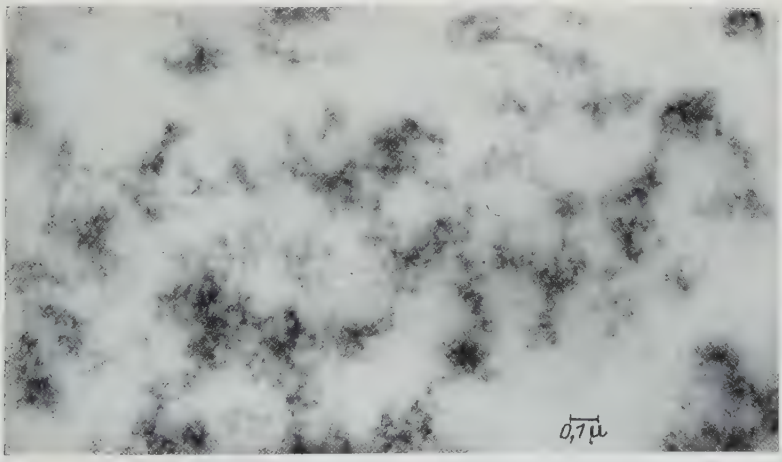


Fig. 6. Axon, 72 hours after nerve section. Intertwined axonfilament-fragments are agglomerating. ×36670

From 48 hours on, the myelin sheath lying outside the narrow portions of the axon began to collapse; the myelin lamellae gradually exfoliated from each other and protruded inwards (Fig. 9). The collapse progressed parallel with the shrinkage of the axon. When the axon was divided into the segments, the lamellae frequently wrapped up them, and formed ovoids (NOVACK and MONTEGA 1952) or "Ellipsoide" (BETHE 1903) (Fig. 8, 11 and 32).

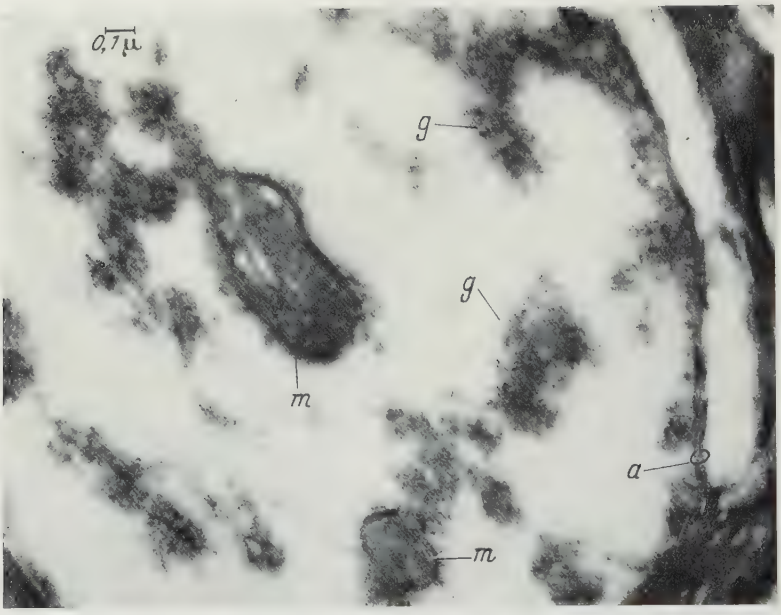


Fig. 7. Degenerated axon, 72 hours after nerve section. Note the light axoplasm. *m* degenerated mitochondrion, *g* agglomerates of intertwined axonfilament-fragments, *a* axon-Schwann membrane. × 35700

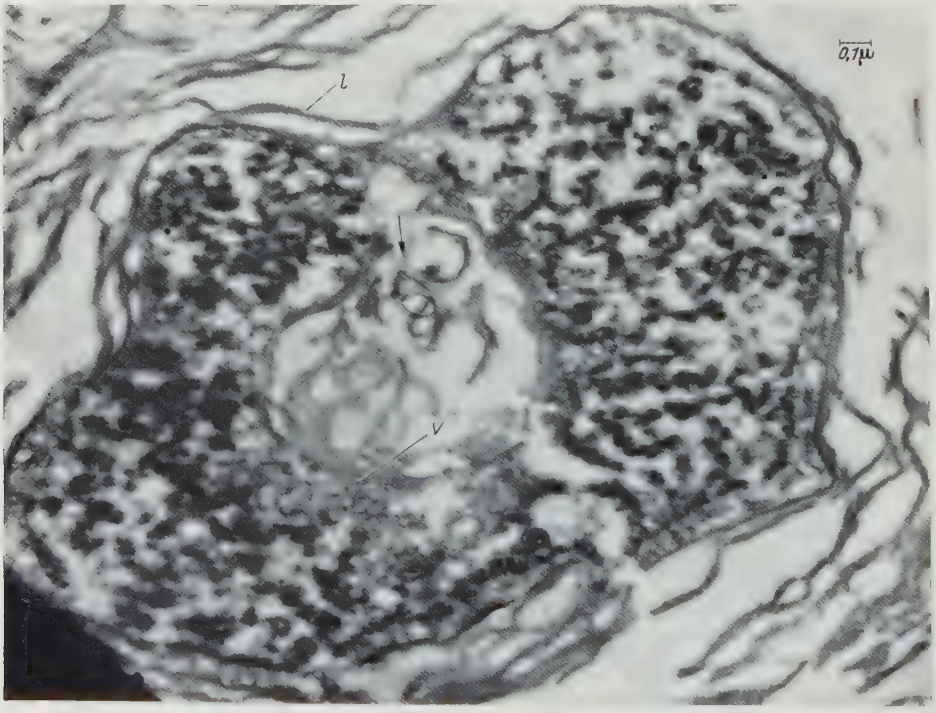


Fig. 8. An ovoid, 10 days after nerve section. Myelin lamellae are protruded into it (arrow). Many conglomerates of axonfilament-fragments and numerous vesicles can be seen in it. *l* myelin lamella. × 7330

All the exfoliations of myelin lamellae were found in the light layer of the lamellae, probably at the intermediate lines (Fig. 12), but never between the axolemma and the innermost Schwann membrane, *i.e.*, in the axon-Schwann membrane (Fig. 7 and 10).

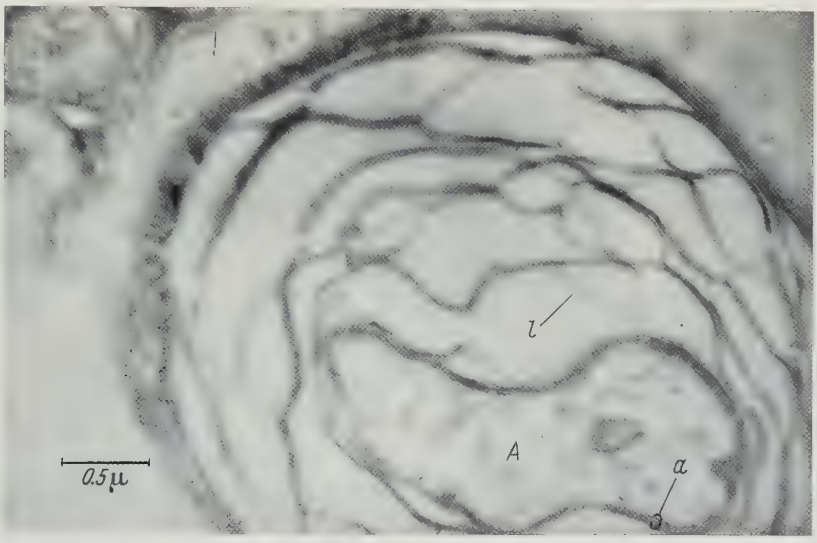


Fig. 9. Part of a cross section through a degenerated nerve fiber, 48 hours after nerve section. *a* axon-Schwann membrane, *l* exfoliated myelin lamella, *A* contracted axon. × 22870

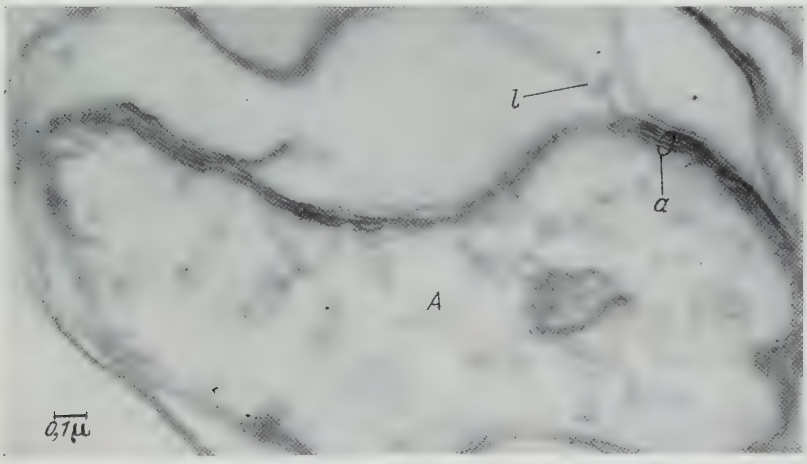


Fig. 10. Part of a cross section through a degenerated nerve fiber, 48 hours after nerve section. *A* axon, *a* axon-Schwann membrane, *l* myelin lamella. × 40650

The destruction of the myelin sheath advanced rapidly when once segmentations of the axon occurred. After the segmentations of the axon and the collapses of the myelin sheath, a large intracellular space remained within the S-cell. The myelin sheath was disintegrated into the fragments of various shapes and sizes by invasions of the S-cell cytoplasm (Fig. 1, 13, 16, 21—23). Most of them were myelin globules. In the earlier stages of degeneration, the larger globules were

seen, which kept the nearly normal lamellar structure (Fig. 13). The large globule was often broken up into smaller ones. Thus in the later stages, the small-sized globules became a large number and then faded away (Fig. 14—16, 32 and 35).

During this process, the fine structures of myelin fragments began to change from the 6th day after the nerve section in the small and in the medium fibers, and from the 8th day in the large. At first, myelin fragments increased in density, often giving very dense particles, about 250—600 Å in diameter, lying closed to

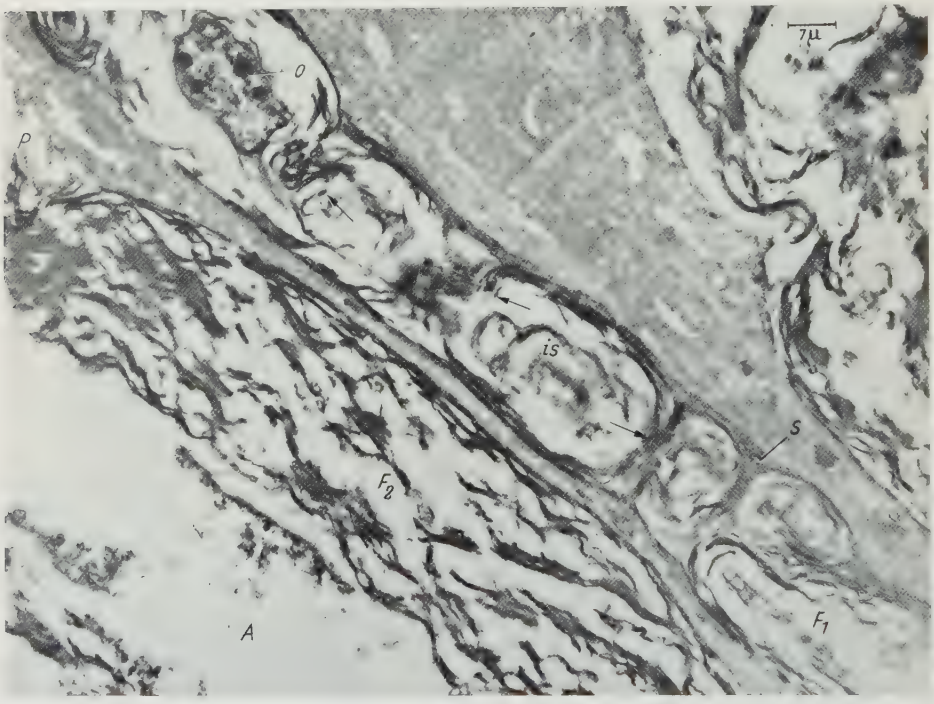


Fig. 11. Longitudinal section of two degenerated nerve fibers, 96 hours after nerve section. In the small fiber (F_1), the myelin lamellae curve and protrude inwards, forming partition walls (arrows) in the intracellular space (*is*) of the S-cell. The axon cannot be seen except an ovoid (*o*). In the large fiber (F_2), the myelin sheath is curved along fusiform swellings of the axon (*A*). The S-cell cytoplasm shows a protrusion (*p*). Many agglomerates of axonfilament-fragments are distributed in the degenerated axoplasm. *s* S-cell cytoplasm. × 6000

or within the myelin lamellae (Fig. 16 and 17). Then the light layers of the lamellae and the particles disappeared, and the rough surfaces of the dense layers (Fig. 12) became smooth (Fig. 14—16, 31 and 32). Finally their density decreased gradually and they faded away. The myelin globules seen in Fig. 16 show such decompositions of myelin lamellae ($m_1 \rightarrow m_2 \rightarrow m_3$).

In certain specimens, other changes were found as follows. The myelin lamellae of the myelin globules within the S-cell cytoplasm lost their density, and their dense layers changed into dense particles, about 250—600 Å in diameter, and faint lines, about 45 Å in diameter (Fig. 18). In other S-cells, myelin lamellae became disintegrated into numerous filaments, 20—40 Å in diameter (Fig. 19). The small myelin globules embedded in the S-cell cytoplasm were occasionally concentrated into the medium dense droplets losing their lamellar stucture

(Fig. 16, 20 and 37); the author named these droplets M-bodies. In the later stages of degeneration, a few electron-opaque bodies were found in the S-cells or macrophages (Fig. 16, 24 and 37). They are the last remnants of myelin degeneration products.

Generally spoken, the myelin fragments lying in the small S-cells disappeared about 12 days after nerve section, and in the medium after 20 days. On the other

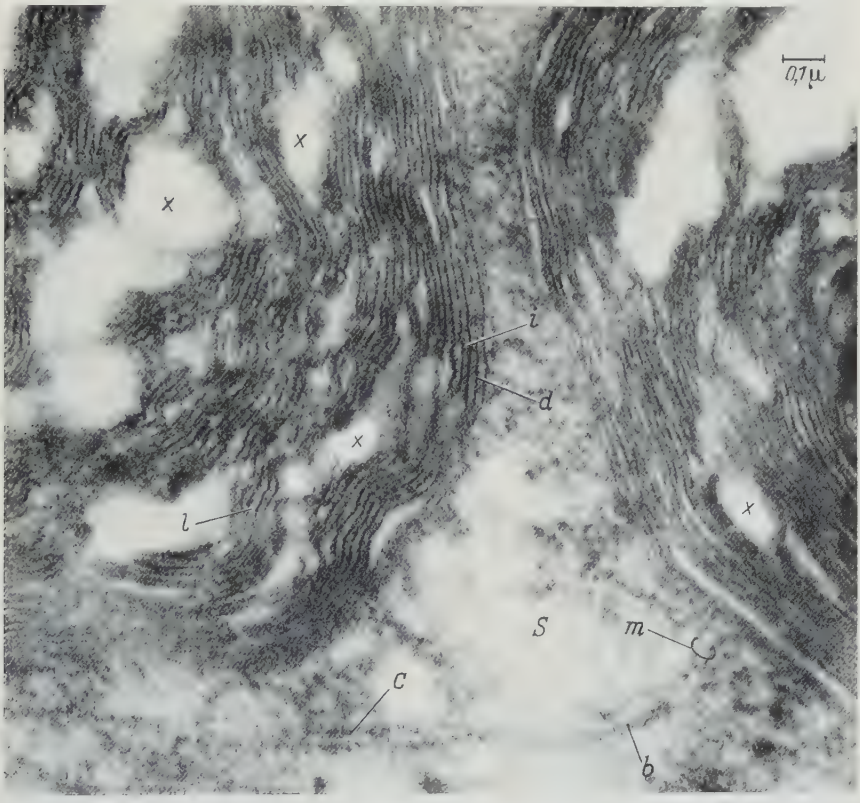


Fig. 12. Part of a cross section through a large fiber, 6 days after nerve section. The myelin sheath has a nearly normal structure but there is a beginning of exfoliations of myelin lamellae (×). *d* dense layer of myelin lamella, *l* light layer, *i* intermediate line, *S* S-cell cytoplasm, *c* S-cell surface membrane, *m* mesaxon, *b* basement membrane. × 57 000

hand, their disappearance proceeded very slowly in the large S-cells (Fig. 21), and here numerous myelin remnants could still be found after 55 days.

Changes of Schwann-cell. At first, the S-cell cytoplasm wedgewise protruded inwards along the curved myelin sheath. The cytoplasm contained few structures in its light matrix (Fig. 11).

After collapses of the axon and of the myelin sheath, the cytoplasm of the S-cell began to extend inwards to fill up its intracellular space, enclosing the myelin remnants (Fig. 21—25). In the enlarging cytoplasm, many granules were distributed throughout a matrix, which is electron-denser than the normal (Fig. 23 and 26). In some S-cells, however, the cytoplasm, in which few granules were scattered in a less dense matrix, more rapidly expanded into the intracellular

space (Fig. 22). This is probably due to an edema of the cytoplasm. Intracellular space of S-cells thus gradually became disappeared. But those of large-sized S-cells were frequently widened into oval or spherical shape with the rising liquid contents during the progressive decompositions of the myelin remnants.

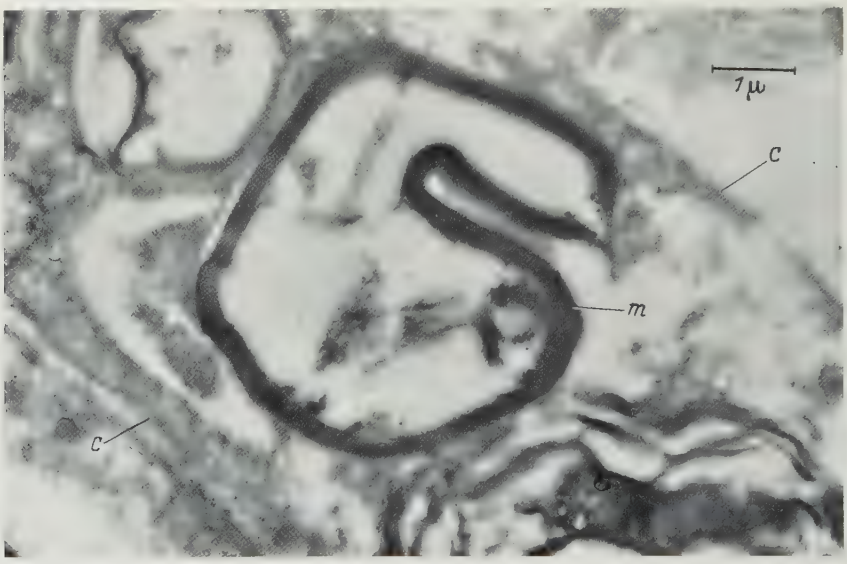


Fig. 13. Part of a degenerated fiber, 10 days after nerve section. *m* myelin globule, *s* S-cell cytoplasm, *c* S-cell surface. × 11 000

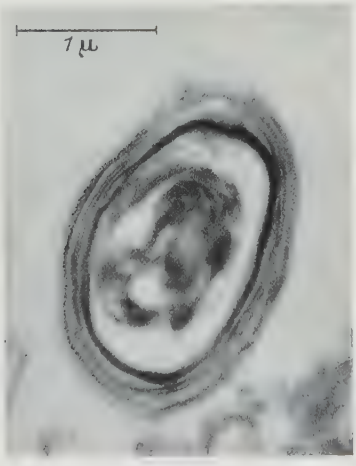


Fig. 14. Small myelin globule showing spiral profile, 14 days after nerve section. × 18 700

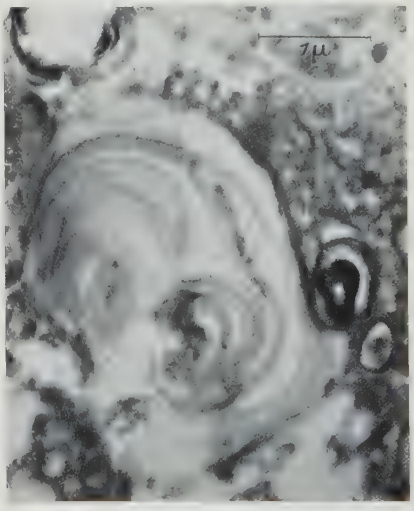


Fig. 15. Small myelin globules showing spiral profile, 14 days after nerve section. × 14 600

The S-cell nuclei also started enlargements and multiplications from about 4 days after nerve section in the small and medium S-cells, and from 6 days in the large. The enlarged nucleus was filled with numerous granules and showed more than two nucleoli. The nuclear membrane was fenestrated, so as to allow a

communication between cytoplasm and karyoplasm (Fig. 26). This finding supports the hypothesis shown by Watson (1954), Anderson and Beams (1956), that the nuclear granules pass into the cytoplasm through the pores of the nuclear

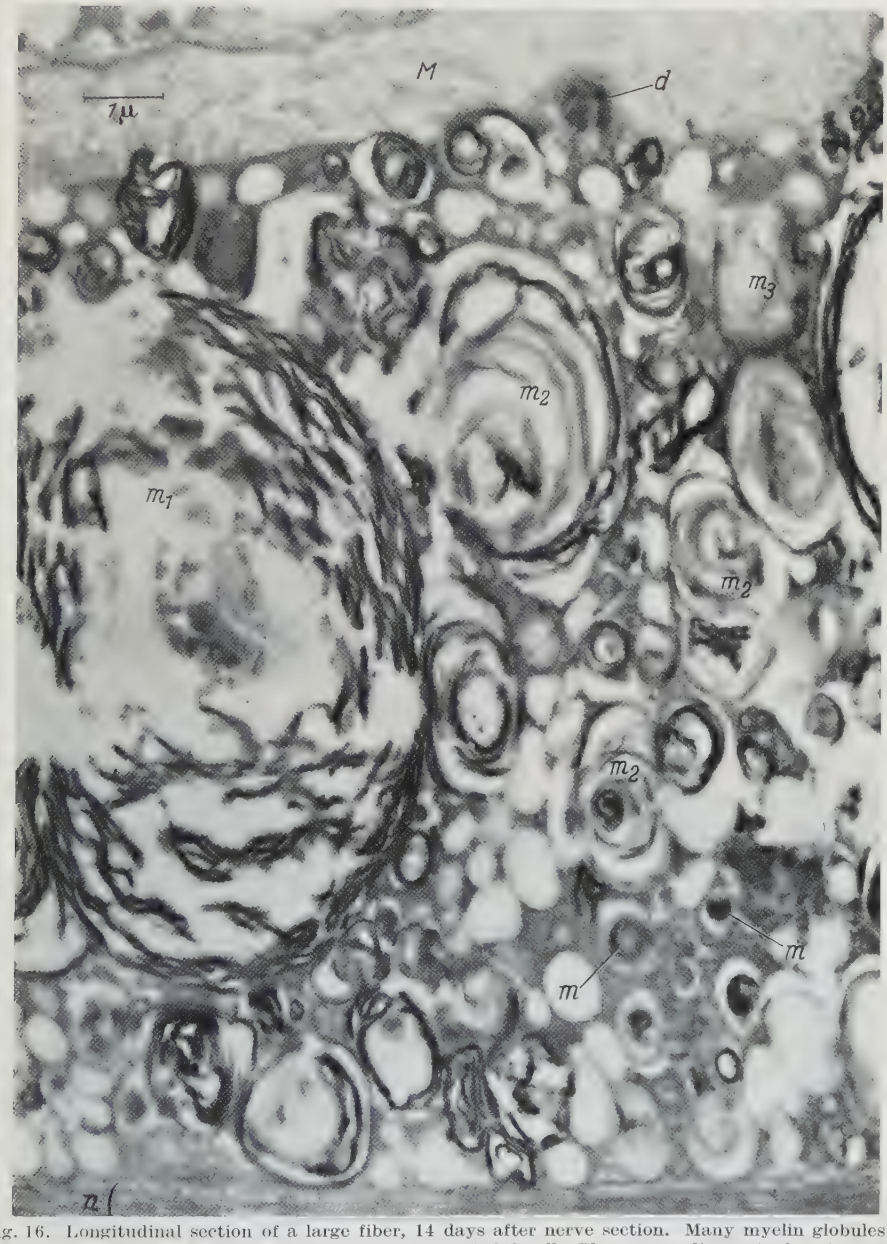


Fig. 16. Longitudinal section of a large fiber, 14 days after nerve section. Many myelin globules of various seizes are closely packed within the degenerated S-cell. The surrounding cytoplasmic matrix is dense and the cytoplasmic structures are indiscernible. The large globule (m_1) is formed by denser myelin lamellae than the normal with many dense particles as shown in Fig. 17. The smaller globule (m_2) looks onion-like, consisting of the less dense lamellae; the light layers are invisible and the dense layers show smooth surface. Myelin lamellae become fainter in the globule (m_3) and are fading away. A macrophage (M) invading the S-cell has engulfed an opaque droplet (d). m M-body, n neurilemmal collagen fibrils. × 9300

Table 1. *Morphological changes during Wallerian degeneration of the myelinated fiber*

Stage	Hours after nerve section	Axon	Myelin sheath	Schwann-cell	Macrophage
The early stage	—24	Endoplasmic reticulum and mitochondria begin to degenerate			The number of macrophages increases from about 6 days. They become many between 16 and 40 days; afterwards decrease in number very slowly
	24—48	Shape of axon begins to change into fusiform swellings connected by narrow strands of axoplasm	Myelin lamellae ensheathing the narrowing portions of the axon begin to collapse. This change proceeds parallel with the shrinkage of the axon		
	48—72	Axonfilaments disintegrate into fragments, which gradually agglomerate. Axoplasm degenerates and intra-axonal edema occurs			
	The last change in this stage	Axon breaks up into segments	Myelin sheath is broken up into large ovoids and globules	Intracellular space remains in the S-cell, after segmentations of the axon and collapses of the myelin sheath. The cytoplasm begins to extend into the space. Then the nucleus starts enlargement and multiplication	
The middle stage (Refer to Table 2)		The degenerated formations of axon decrease their density slowly and then become disappeared	Large myelin globules are gradually broken up into smaller ones. Light layers of the myelin lamellae first disappear. Then the density of their dense layers slowly decreases, and they fade away. M-bodies and opaque bodies are seen in the latter half of this stage	The cytoplasm gradually fills up the intracellular space, resolving the myelin debris lying in it. S-cells multiply themselves, but some of them degenerate into cytolysis. (Refer to Fig. 34)	
The late stage (Refer to Table 2)				S-cell becomes elongated shape and composes *"Büngnersches Band"*	

Table 2. *Degeneration stages in the nerve fibers of various diameters*

Degeneration stage	Small nerve fiber	Medium nerve fiber	Large nerve fiber
The early stage . . .	~72 hours after the nerve section	~96 hours	~6 days
The middle stage . .	72 hours~10 days	96 hours~20 days	6~55 days
The late stage	10 days ~	20 days ~	55 days ~

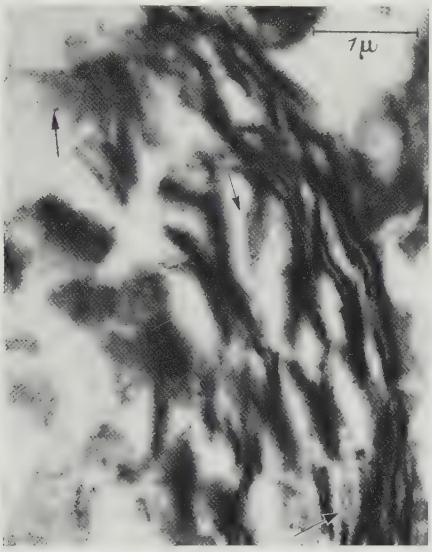


Fig. 17. Part of the globule (m_1) from Fig. 16 under high magnification. Dense particles are indicated by arrows. × 13700

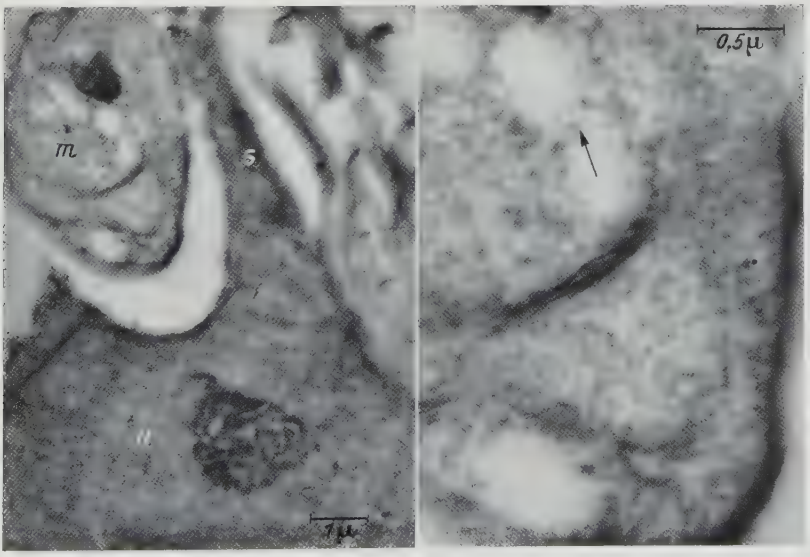


Fig. 18. Decomposing myelin globule (m), embedded within the S-cell cytoplasm (s) 10 days after nerve section. n S-cell nucleus. ×7800. — Part of the globule is shown under high magnification in the right figure. The dense layers of myelin lamellae are seen as particles joined by faint lines (arrow). The layers are already disappeared. × 23450

membrane. Moreover, the S-cell nuclei were diversified in shape. The pseudopode-like projections of the nucleus were mostly pointing towards the intracellular space (Fig. 23).

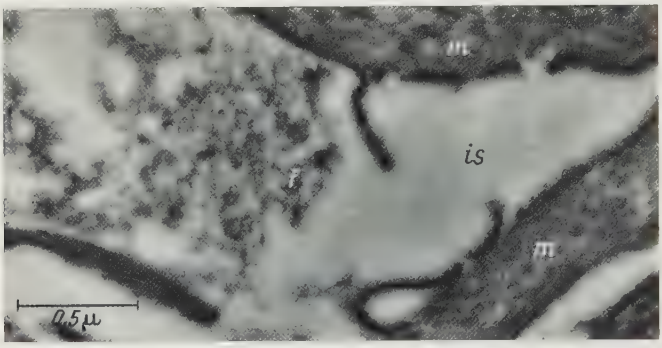


Fig. 19. Ten days after nerve section, myelin sheath (*m*) is resolved into bundles of numerous faint filaments in the intracellular space of S-cell (*is*). They appear in mass at *f*. × 31 700

In the middle stages of degeneration, most S-cells multiplied themselves. But some S-cells degenerated into cytolysis; the nucleus underwent a pycnosis and dense particles appeared in the condensed cytoplasm (Fig. 16 and 31). After disintegration of the cell, the myelin fragment sand the cytoplasm remnants remained in the neurilemmal space surrounded by the collagen fibrils (Fig. 32).

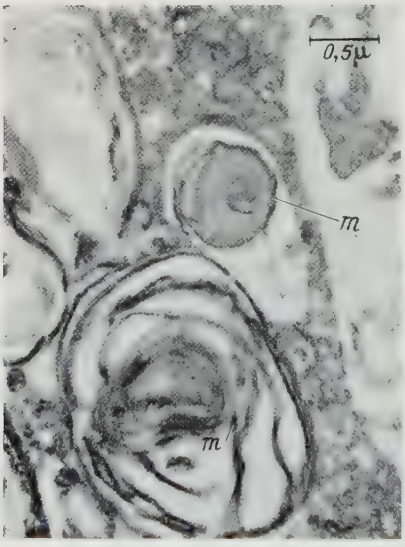


Fig. 20. M-body (*m*) in the S-cell cytoplasm, 14 days after nerve section. *m'* myelin globule. × 17 500

When the intracellular space was filled up by the cytoplasm, the tubular form of the S-cell changed into an elongated one (Fig. 34). The latter cell type appeared about 12 days after the nerve section in the small S-cells, between about 12 and 20 days in the medium, and even more slowly in the large. Since disappearance of the space, the granules in the S-cell cytoplasm gradually diminished in number and its matrix became as less dense as the normal; the nucleus reduced its size with the decreasing number of nucleoli, and became oval shape (Fig. 27—30).

The S-cell cord was composed of many elongated S-cells, in which the intracellular space almost or completely disapeared, in the late stages of degeneration (Fig. 28—30). The cords of small S-cells appeared from about 12 days after nerve section and those of the medium cells from about 14 days onwards.

According to these findings, the morphological changes in Wallerian degeneration of the myelinated fibers could be divided into three stages as shown in the Table 1 and 2.

Discussion

Autolysis of axon. From about 72 hours after the nerve section onwards, the axoplasm becomes as light as the interstitial fluid (Fig. 7, 11). This change in electron-density, which is accompanied with increase of the axonal diameter, suggests not only a degeneration of the axoplasm but also a rise of the water content inside the axon, *i.e.* intra-axonal edema. Johnson and others (1949) report that an edema of peripheral nerve stump in Wallerian degeneration reaches

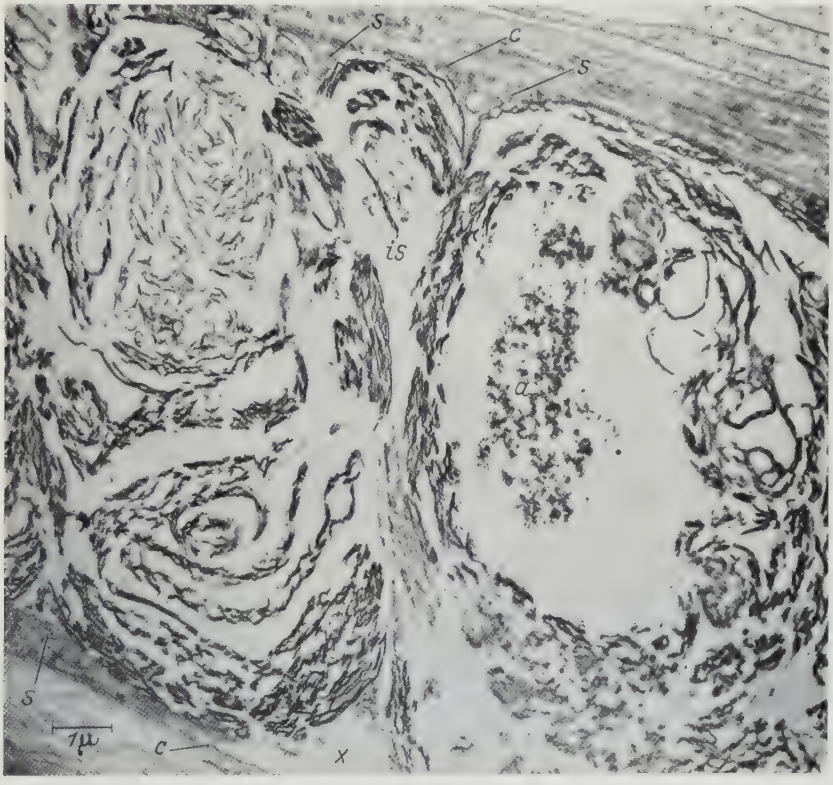


Fig. 21. Longitudinal section of a large S-cell, 44 days after nerve section. Enlargement of the cytoplasm is delayed. The interior of the cell is occupied by the large intracellular space (*is*), in which many myelin fragments and axon remnants (*a*) are remained. The S-cell cytoplasm (*s*) is partially invisible at ×. *c* S-cell surface membrane. × 6200

its maximum 4 days after the nerve section. The edema may thus be due to the axonal autolysis, in addition to the interstitial edema (Johnson and others 1949) which is probably brought about by the lesion of the vasomotor nerves (Krücke 1955).

The disintegrations of axonfilaments in Wallerian degeneration (Fig. 6—8) are very similar to those in the nerve fibers immersed in Ringer's solution of acid pH (Ogura and Sato 1958). This suggests that the interior of the degenerated axon or of the S-cell's intracellular space, in which the axonfilament-fragments lie, may be filled with a liquid of low pH, which probably causes increased activity of acid-phosphatase in the S-cell (Samorajsky 1957).

Based on the light microscopic findings, GUTMANN and HOLÜBAR (1950) described that nerve impulses are no longer transmitted when the loss of continuity of the axon arises 71 to 78 hours after the nerve section. My electron micrographs show the complete degenerations of the axonfilaments and of the axoplasm 72 hours after the nerve section. These changes of the axon may be related to the ceasing of the nerve function.

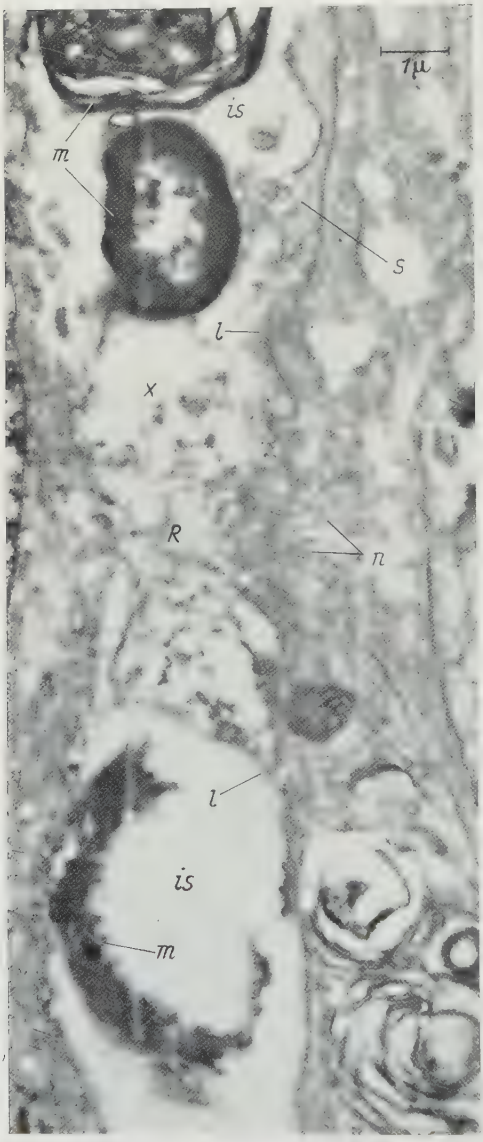


Fig. 22. Longitudinal section through a small fiber, 6 days after nerve section. The axon is invisible. The S-cell cytoplasm (*s*) has filled the intracellular space (*is*) in the region of node of RANVIER (*R*). The limiting membrane (*l*) facing the space is invisible in places (×). *m* myelin fragment, *n* neurilemmal collagen fibrils. × 8830

Destruction of myelin sheath. A myelin sheath belongs to the S-cell (GEREN 1954). Nevertheless, whenever the axon partially decreases its diameter and segments, the myelin sheath wrapping that portion collapses. This is considered by YOUNG (1945) to be caused by a decline of the axonal pressure which supports the myelin sheath from inside. But, the collapse may be due to the inseparability between the axolemma and the innermost Schwann membrane of the myelin sheath, which form the axon-Schwann membrane.

Some of the workers assumed that the myelin fragments lie in the old Schwann tube consisting of the thick, collagenous Schwann membrane (CAJAL 1928, HOLMES and YOUNG 1942). The electron micrographs, however, show that the latter membrane is of unreality; there is a very thin basement membrane in the position which was formerly supposed to be occupied by the Schwann membrane. The fragments of the myelin sheath are situated in the intracellular space of the S-cell. The fragments can get free only from the disintegrated S-cells (Fig. 31 and 32).

The myelin globules are not composed of a homogeneous fluid, but possess the characteristic lamellar structures (Fig. 16, 21—23, 35—37); the large globules consist of many concentrically arranged myelin lamellae, and the small are formed by a few lamellae showing a spiral profile (Fig. 14—16 and 31). It is therefore

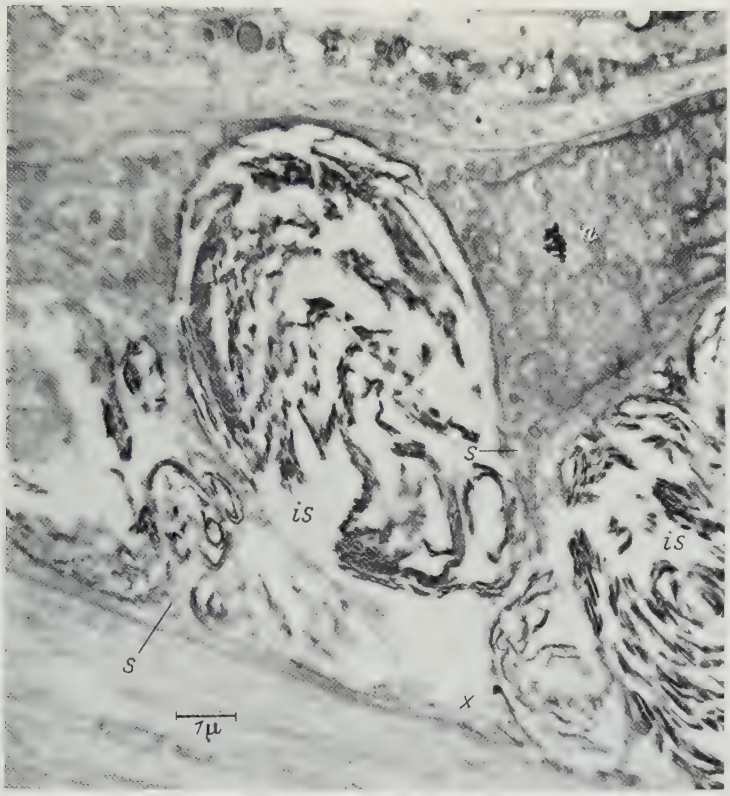


Fig. 23. Oblique section through a large S-cell, 44 days after nerve section. The cytoplasm (*s*) is enlarging wedgewise into the intracellular space (*is*) containing large myelin globules. The cytoplasm is partially invisible (×). *n* S-cell nucleus. × 7770

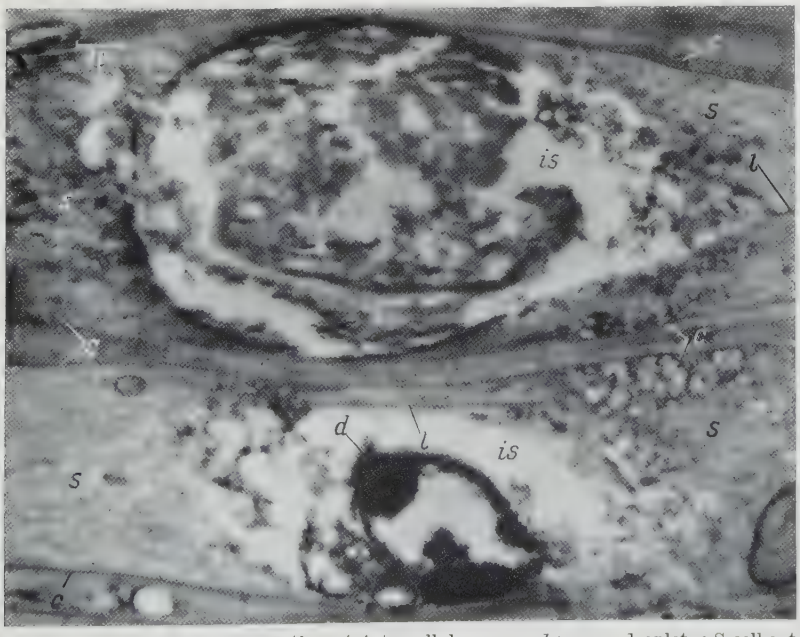


Fig. 24. S-cells, 12 days after nerve section. *is* intracellular space, *d* opaque droplet, *s* S-cell cytoplasm, *l* limiting membrane of cytoplasm, *c* S-cell surface. × 5130

unlikely that the globules are drops given by the surface tension of the myelin (SPIEGEL 1922, YOUNG 1945).

A myelin sheath is broken up into globules by the invasions of the S-cell cytoplasm (Fig. 23). Even in the neurilemmal or interstitial space, however, myelin lamellae of the globules can keep the concentric or spiral features (Fig. 31 and 32). Presumably, myelin lamellae may be able to curve themselves spontaneously and take a spiral form. This nature of myelin lamellae is not exerted in the normal nerve fibers, because the myelin sheath is supported by the axon from inside (YOUNG 1945).

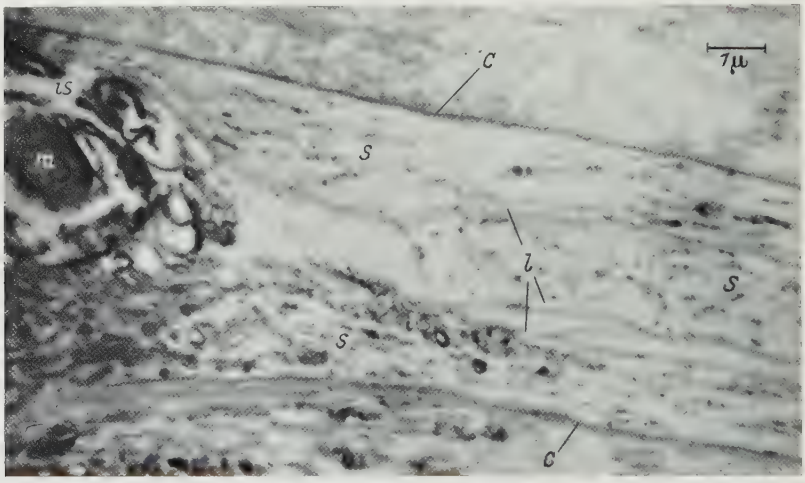


Fig. 25. Part of a S-cell, 44 days after nerve section. *m* myelin fragment, *s* S-cell cytoplasm, *l* limiting membrane, *is* intracellular space, *c* S-cell surface. × 7280

The chemical decomposition of myelin lamellae is probably represented by the changes in the fine structures of the lamellae. The dense particles, which are the first resolvents, are mostly produced between about 6 and 16 days after the nerve section, when the cholesterol-ester content also increases (JOHNSON and others 1949). Possibly, these particles may contain cholesterol-ester.

Multiplication of Schwann-cell. JOHNSON and others (1950) considered that a factor inducing the S-cells to multiply in Wallerian degeneration will be either a chemical mediator from axonal degeneration products or a physical factor due to the space lying inside the nerve sheath. The latter space is probably equivalent to the intracellular space of the S-cell shown in the present study.

In the electron micrographs, the axonal autolysis can be seen in all fibers by the 4th day after the nerve section. But the large-sized S-cells begin to multiply themselves, later from the 6th day onwards. This process does not seem to be explained with "a chemical mediator from the degenerated axon". The growth of the cytoplasm is a S-cell and the increase of its nucleus in size and number start from the stage, when a intracellular space is left within the cell after collapses of the myelin sheath. This suggests that these changes are caused either by the developement of the intracellular space or by the collapse of the myelin sheath.

The granules in the S-cell cytoplasm vary in number parallel with its growth. They become numerous in the stage when the cytoplasm is extending into the

intracellular space; they gradually decrease, as the growth of the cytoplasm declines after filling up the space. In other tissue cells, the cytoplasmic granules are considered to contain RNA which plays an important role in synthesis of the

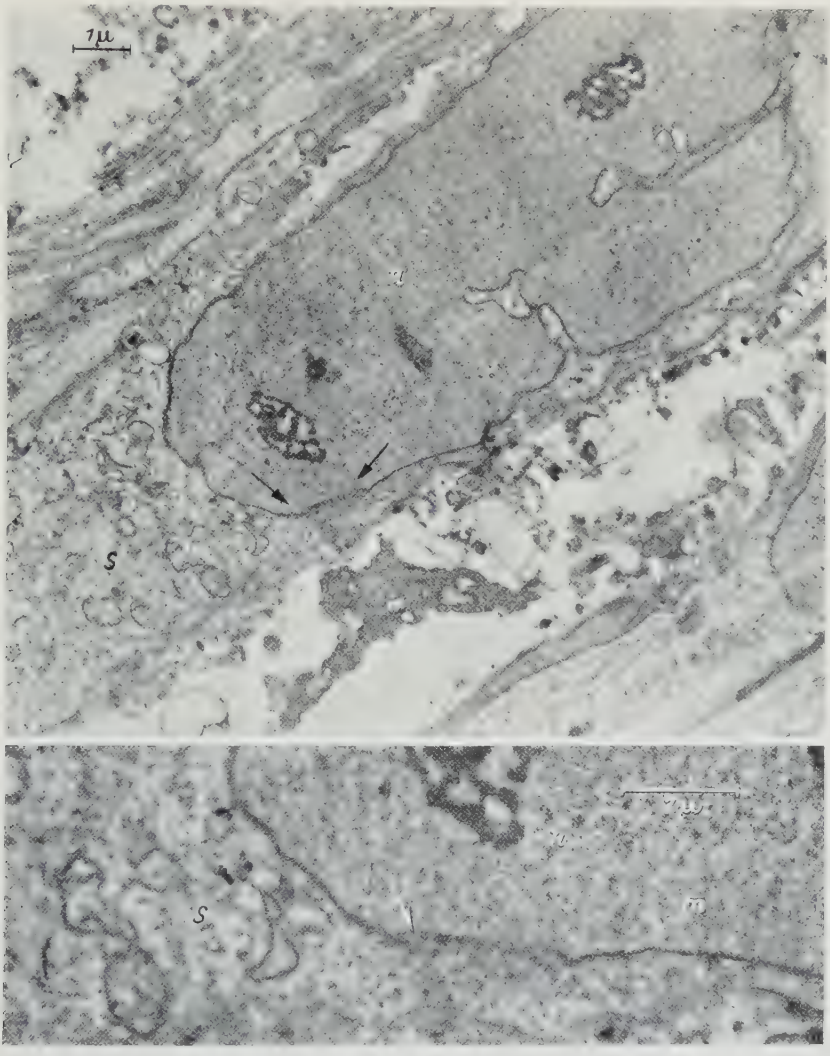


Fig. 26. a: Part of an elongated S-cell, 14 days after nerve section. Many cytoplasmic formations can be seen in the somewhat dense matrix (*s*). The polygonal nucleus (*n*) is filled with numerous fine granules. × 7590. — b: The nuclear membrane (*m*) is fenestrated (arrow), as shown under high magnification. × 16750

cytoplasm (Palade and Siekevitz 1956, Tashiro and Ogura 1957). Likewise, the granules in the S-cell may be concerned with the production of cytoplasm.

Invasion of Schwann-cell cytoplasm into the intracellular space and decomposition of the myelin fragments. The myelin fragments and the axonal degeneration products lying within a S-cell are gradually resolved into disappearance either in the invading cytoplasm or in its intracellular space. On the whole, the myelin

fragments closely embedded in the cytoplasm are more rapidly resolved than those lying in the large space. In some S-cells, in which the cytoplasm is poorly developed, chemical decomposition of the myelin remnants is markedly delayed (Fig. 21).

Thus a S-cell is able to decompose the myelin debris lying within the cell. But the myelin fragments, remaining in the neurilemmal or interstitial space after disintegrations of some degenerated S-cells (Fig. 31 and 32), are never ingested even by the intact S-cells. They are removed by macrophages.

In filling up the intracellular space or in enclosing myelin remnants, the limiting membrane of the invading S-cell cytoplasm becomes often partially in-

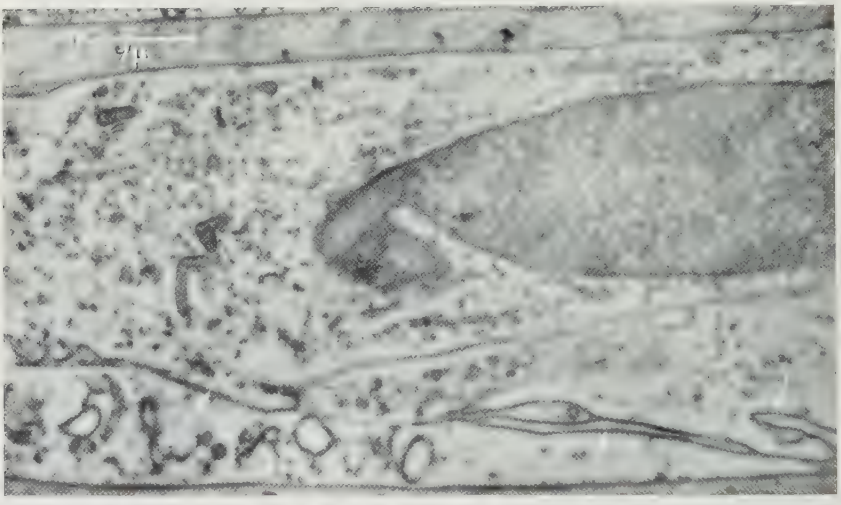


Fig. 27. Part of a S-cell cord, 44 days after nerve section. The number of cytoplasmic granules is decreased as compared with the S-cell seen in Fig. 26a. Note the oval shape of the nucleus (*n*). Double membranes are found in the cell (arrows). × 15 200

visible; the cytoplasm becomes less dense or electron-transparent and indiscernible from the space (Fig. 13, 22 and 23). In such cases, the cytoplasm may change into a sol losing its limiting membrane (Fig. 33).

Schwann-cell cord. SPEIDEL (1932, 1933), ABERCROMBIE and JOHNSON (1942) report that the S-cells migrate from the degenerated nerve fibers, but cannot move out from the normal or predegenerated fibers. Probably, owing to the inseparability of the axon-Schwann membrane, the S-cell is unable to emigrate until the membrane breaks up at the nodes of RANVIER.

In the middle stages of degeneration, some S-cells degenerate into cytolysis, and the other S-cells shrink themselves with disappearances of the axon and of the myelin sheath. As this result, the S-cells, which were arranged in file around a myelinated axon (GEREN 1957), are here and there separated from each other. Afterwards these cells multiply themselves, emigrate and compose a S-cell cord, *i.e.* "Büngnersches Band" (v. BÜNGNER 1891, HOWELL and HUBER 1893). Each S-cell has a surface membrane (Fig. 28—30). This confirms the finding shown by HOLMES and YOUNG (1942) that the tissue is no Schwann-cell syncitium.

So-called macrophages inside the Schwann tube. CAJAL (1928), HOLMES and YOUNG (1942) described that macrophages invade into the so-called Schwann tube

and remove the myelin remnants lying inside it. The electron micrographs, however, show that macrophages cannot invade normal S-cells. They ingest only the myelin debris situated outside the S-cells. The cells might be misunderstood

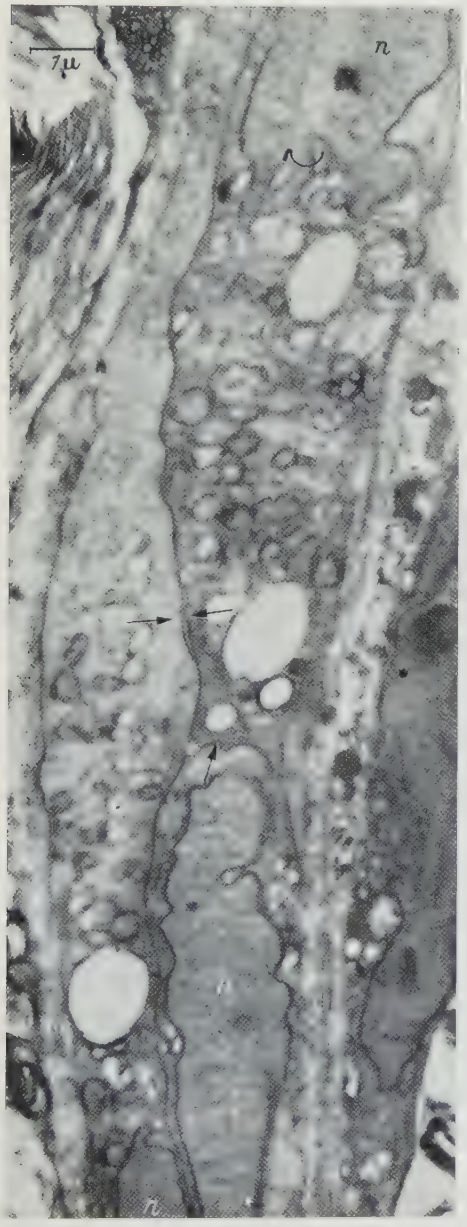


Fig. 28

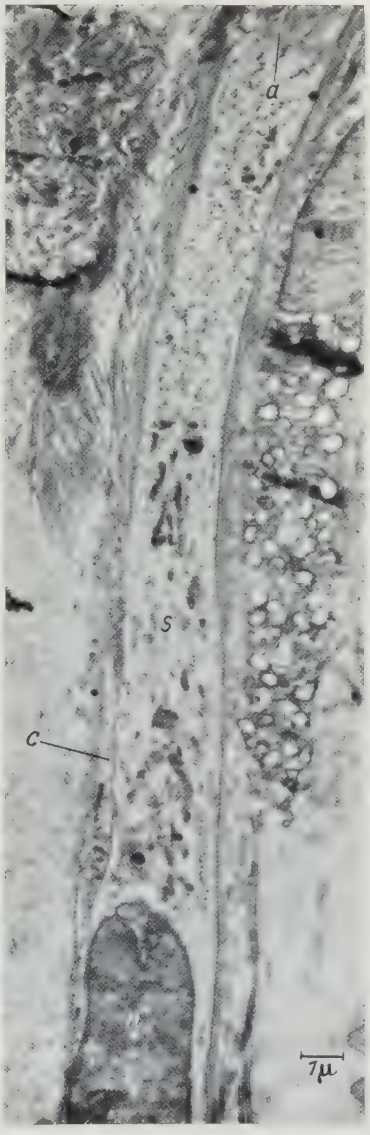


Fig. 29

Fig. 28. S-cell cord, 14 days after nerve section. The surface membranes of the elongated S-cells are indicated by arrows. *n* S-cell nucleus. × 8130

Fig. 29. S-cell cord (*s*) and part of a contacting S-cell (*c*), 44 days after nerve section. *n* S-cell nucleus, *a* anastomosis of S-cells. × 5500

under the light microscope, as if they were the macrophages which invaded into the Schwann tube, when

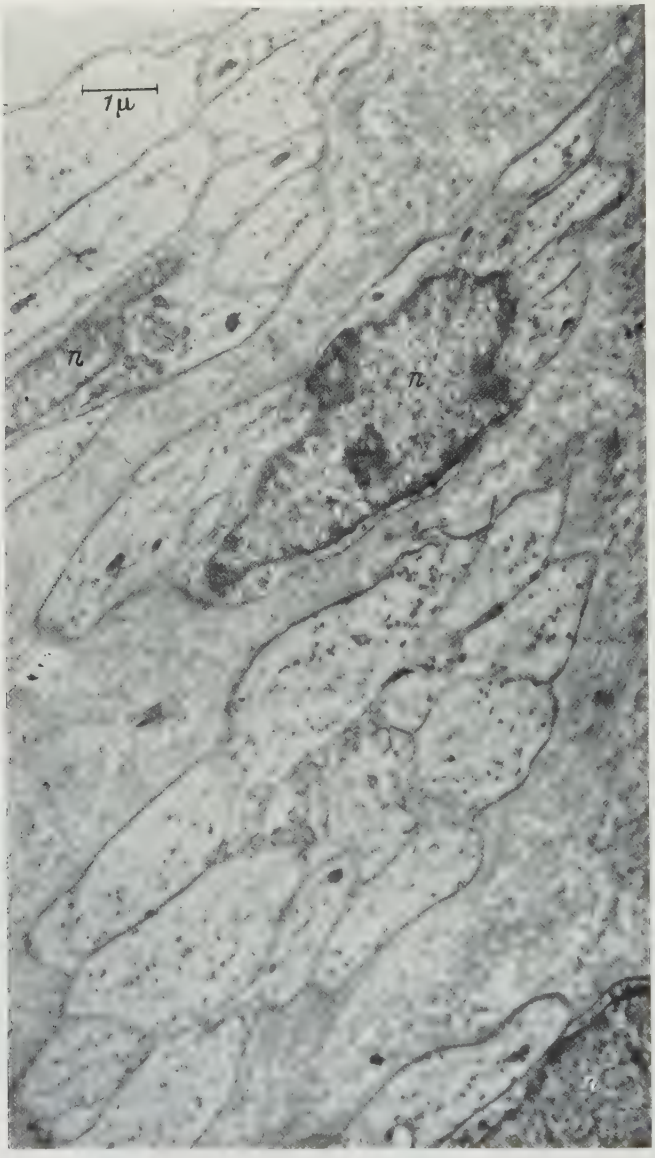


Fig. 30. Oblique section through S-cell cords, 28 days after nerve section. Each cord consists of more than two S-cells. *n* S-cell nucleus. × 9600

1. true macrophages filled the neurilemmal space after disappearance of the S-cells.

2. S-cells had many myelin fragments, vacuoles and the scanty cytoplasm, or they were deformed into irregular shapes by pressure of other cells or myelin fragments.

3. S-cells were partially disintegrated; they frequently showed macrophage-like outlines (Fig. 35—37) and were situated in groups in the neurilemmal space.

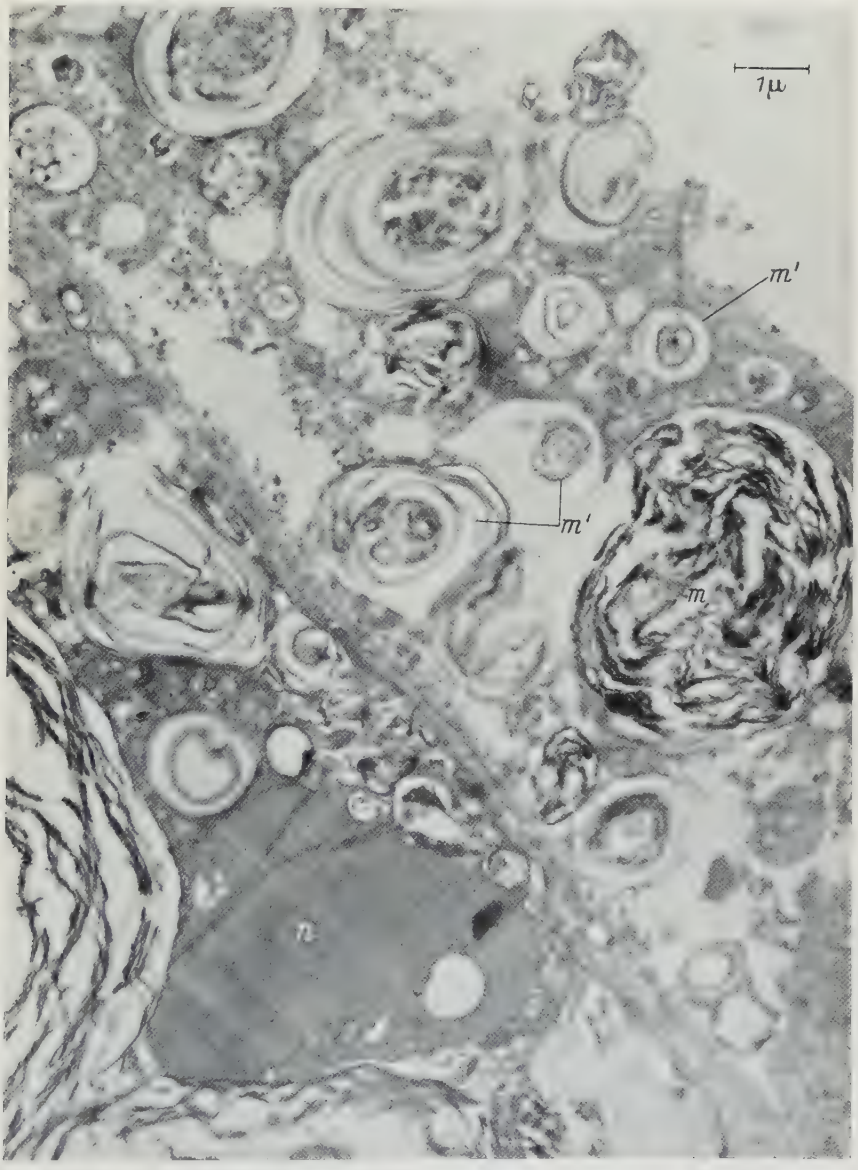


Fig. 31. Portion of two degenerated S-cells, 14 days after nerve section. In the S-cell seen on the lower and left side of the figure, the nucleus (*n*) shows pycnosis with a vacuole. Myelin globules are enclosed in the cytoplasm. On the upper and right side, there are disintegrated S-cell and many myelin globules. Myelin lamellae of a globule (*m*) are of nearly normal density. But other globules consists of less dense lamellae. Some of them show spiral profiles (*m'*). × 9600

Weiss and Wang (1945) report that S-cells transform themselves into macrophages in Wallerian degeneration. The author, however, cannot accept their view, because a S-cell is unable to take the myelin remnants lying outside it, though

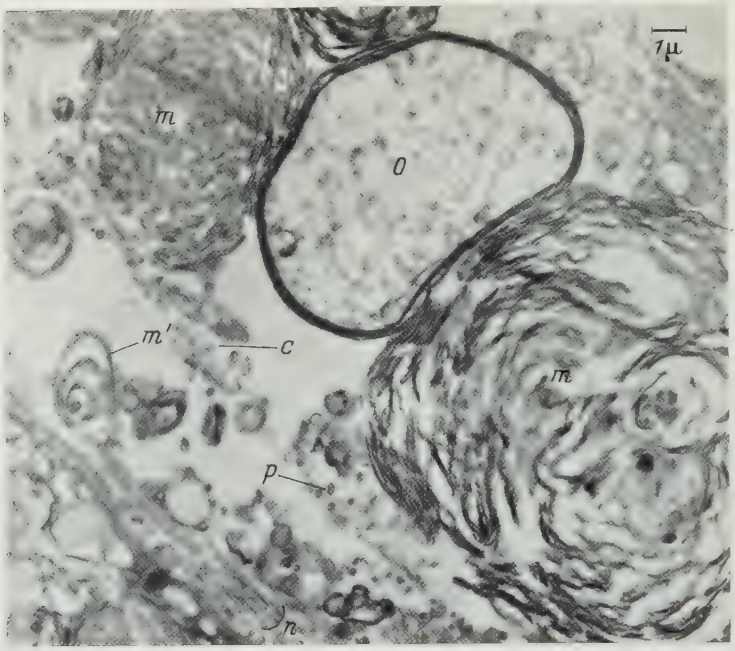


Fig. 32. 14 days after nerve section, large myelin globules (*m*) and an ovoid (*o*) show cord-like arrangement. A small globule (*m'*) formed by less dense lamellae, dense particles (*p*) and cytoplasmic remnants lie in the space fenced by the neurilemmal collagen fibrils (*n*). *c* collagen fibrils. × 4280

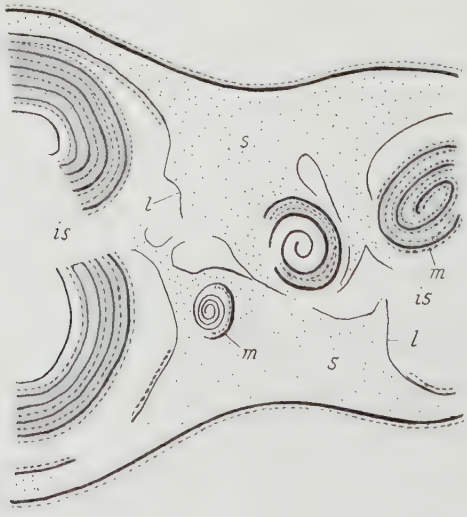


Fig. 33. Illustration of longitudinal section through a degenerated fiber in the middle stages of degeneration. The S-cell cytoplasm (*s*) is extending into the intracellular space (*is*). Its limiting membrane (*l*) becomes often invisible in the wedgeshaped portions of the cytoplasm invading into the space, or in close contact with myelin globules (*m*)

capable of removing those remaining within it. Possibly, the partially broken S-cells might be misunderstood for the macrophages transformed from S-cells, because of their similar contours.

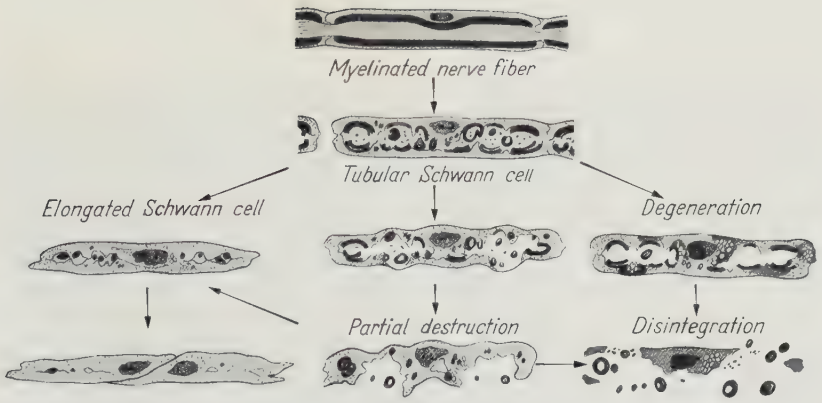


Fig. 34. Diagrammatic representation of the morphological changes of S-cell in Wallerian degeneration. In the middle stages of degeneration, the S-cell is likely to undergo partial destructions occasionally and release the myelin debris out of its intracellular spaces

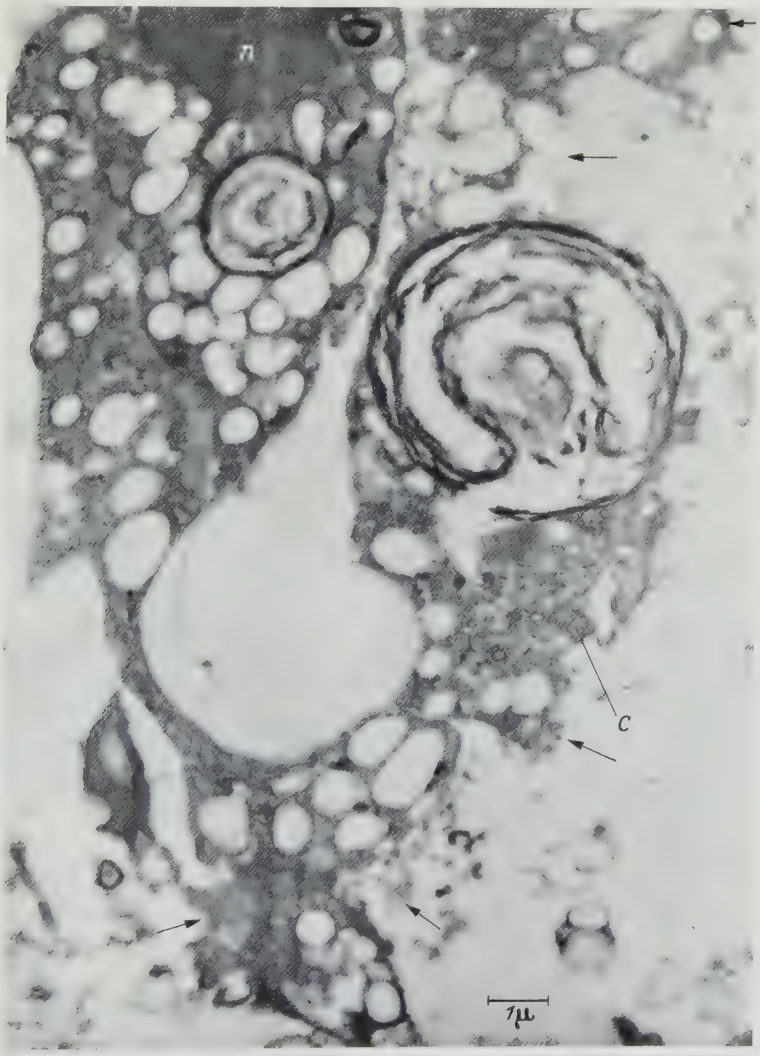


Fig. 35. Part of a partially disintegrated S-cell, having many vacuoles and myelin globules 14 days after nerve section. The cell surface is indented in some regions (arrows). Unknown formations (*c*) are found in the cell, which are oval shaped corpuscles of equal size. The cytoplasm surrounds each corpuscle like a framework. *n* nucleus. × 7930

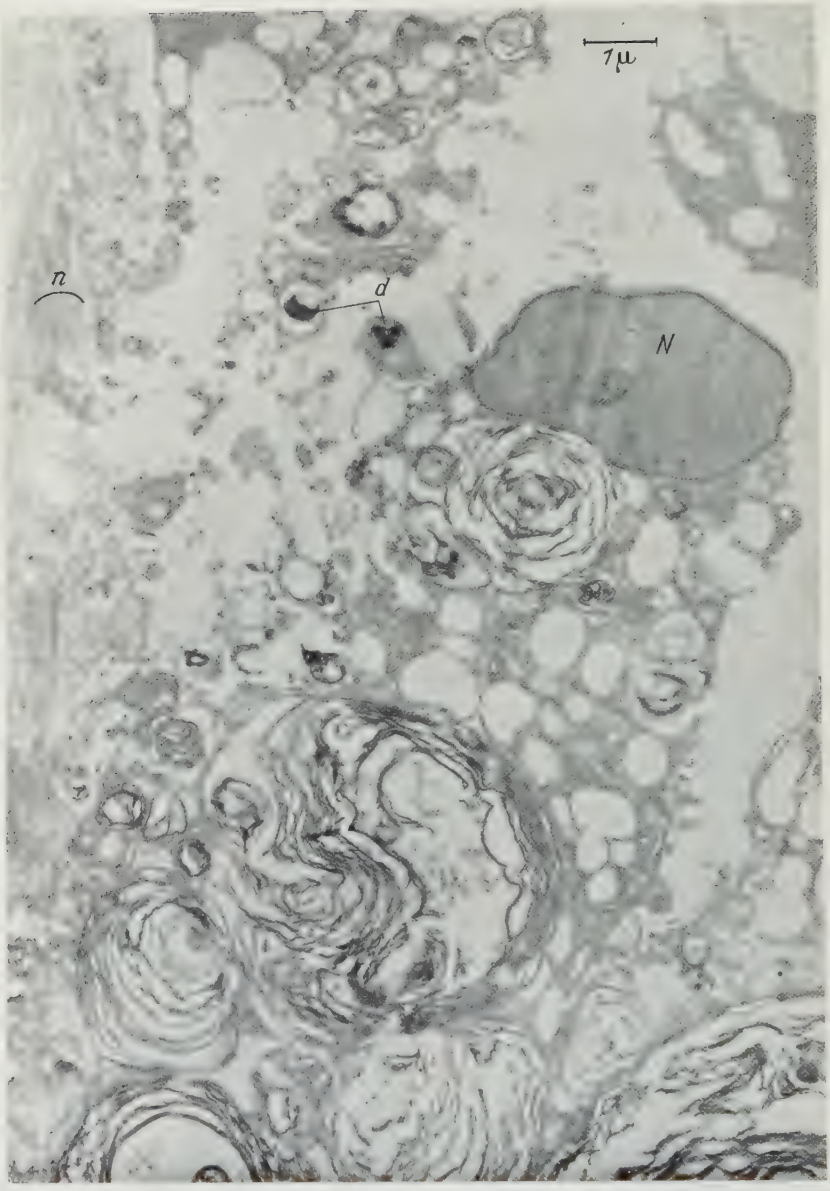


Fig. 36. Disintegrated S-cell with many myelin globules and vacuoles, 14 days after nerve section. *N* nucleus, *d* opaque droplet, *n* neurilemmal collagen fibrils. × 9090

A myelin sheath is part of the S-cell (GEREN 1954, ROBERTSON 1957). It is therefore doubtful, whether the myelin fragments, even when situated outside the cell, are really foreign bodies for the S-cell. Accordingly, the final evidence for the phagocytic ability of S-cell should be sought in other neuropathological studies than Wallerian degeneration. In this respect, NISHIURA and his co-workers (1957) reported that S-cells did not ingest leprosy bacilli from outside of the cells in lepromatous nerve lesions.

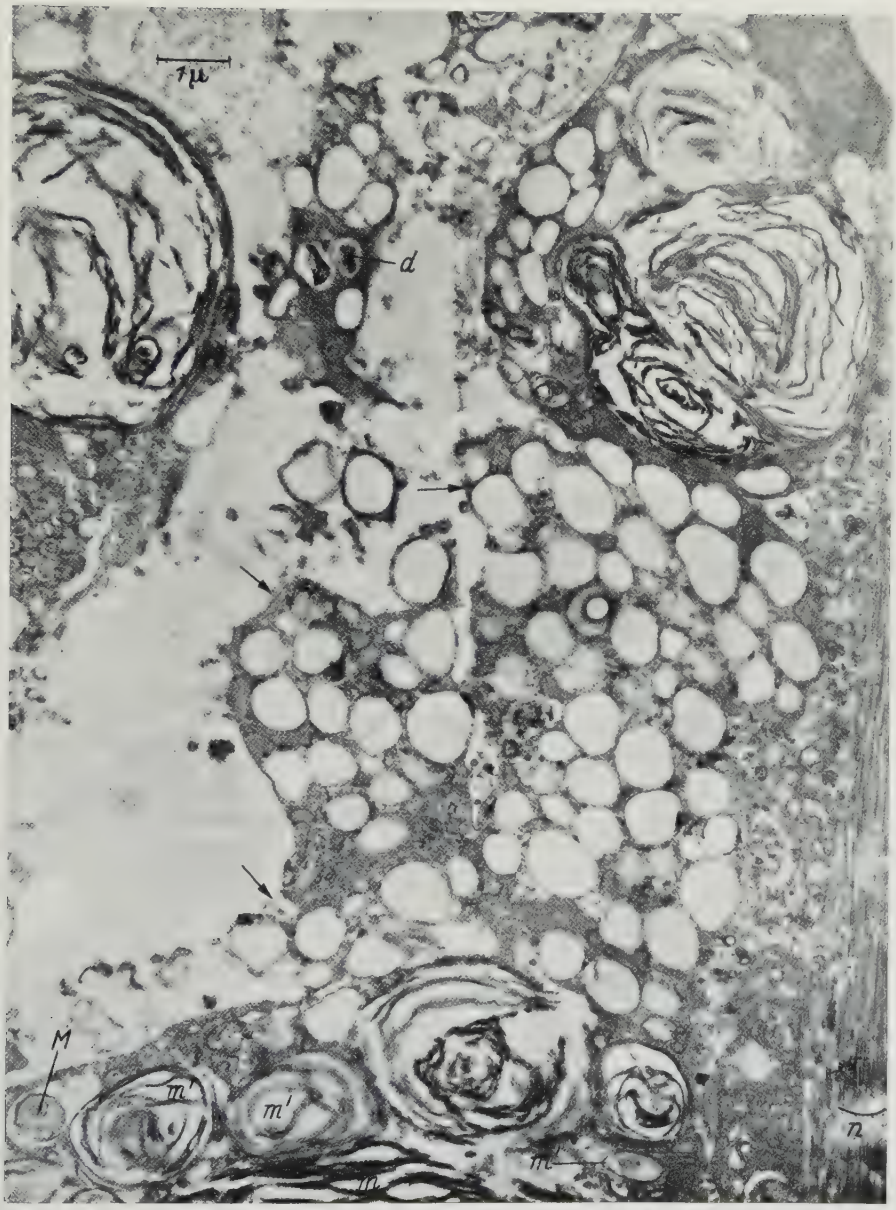


Fig. 37. Part of a partially disintegrated S-cell with many vacuoles, 14 days after nerve section. The cell surface is indented (arrows). Myelin globules in the cytoplasm show the various stages of decomposition of myelin lamellae as detailed in the text. Myelin lamellae of a large globule (m) are of nearly normal density, whereas the smaller globules (m') consist of less dense lamellae showing spiral profiles without the light layers. M M-body, d opaque body, n neurilemmal collagen fibrils. × 8500

Summary

Wallerian degeneration of rabbit's sciatic nerve, especially of the myelinated fibers, was studied.

1. The process of axonal autolysis was shown in electron micrographs. Within 24 hours after nerve section, endoplasmic reticulum and mitochondria began to

degenerate. From 48 hours, axoplasm became degenerate and axonfilaments broke up into fragments, which intertwined and gradually agglomerated.

2. When part of the axon decreased its diameter, the myelin sheath wrapping that portion collapsed inwards. Since segmentations of the axon, the myelin sheath was disintegrated by invasions of the Schwann-cell cytoplasm. The large myelin globules showed nearly concentric lamellar structures and the small consisted of spiral myelin lamellae.

3. Chemical decomposition of myelin lamellae was shown in electron micrographs. Dense particles were first produced in the lamellae. Afterwards the light layers of the lamellae and the particles disappeared. Later, the density of the dense layers of the lamellae slowly decreased and they faded away.

4. After segmentations of the axon and collapses of the myelin sheath, a large intracellular space remained within the Schwann-cell. Then the cytoplasm extended and filled up the space, resolving the myelin debris remaining in it. But the Schwann-cell did not take the myelin fragments lying outside the cell. The author cannot accept that Schwann-cells are able to transform themselves into phagocytic cells.

5. The Schwann-cell cord, "*Büngnersches Band*", was composed of many elongated Schwann-cells. They showed varied anastomoses, but never formed syncytia.

References

Abercrombie, M., and M. L. Johnson: The outwandering cells in tissue culture of nerves undergoing Wallerian degeneration. J. exp. Biol. **19**, 266—283 (1942).

— — Collagen content of rabbit sciatic nerve during Wallerian degeneration. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. **9**, 113—118 (1946a).

— — Quantitative histology of Wallerian degeneration. I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. J. Anat. **80**, 37—105 (1946b).

Anderson, E., and H. W. Beams: Evidence from electron micrographs for the passage of material through pores of the nuclear membrane. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 439—444 (1956).

Bethe, A.: Allgemeine Anatomie und Physiologie des Nervensystems, S. 151—170. Leipzig 1903.

Bucy, P. C.: Studies in degeneration of peripheral nerves. J. comp. Neurol. **45**, 129—155 (1928).

Büngner, O. v.: Über die Degeneration und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. Beitr. path. Anat. **10**, 321—390 (1891).

Cajal, R. y: Degeneration and regeneration of the nervous system, vol. 1, p. 1—396. Oxford University Press 1928.

Fernández-Morán, H., and J. B. Finean: Electron microscope and low-angle X-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 725—748 (1957).

Geren, B. B.: The formation from the Schwann cell surface of myelin in the peripheral nerve of chick embryo. Exp. Cell Res. **7**, 558—562 (1954).

—, and G. Nogueira-Graf: Electron microscope studies of the fromation of node of Ranvier in mouse sciatic nerve. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 589—598 (1957).

Gutmann, E., and J. Holübar: The degeneration of peripheral nerve fibers. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. **13**, 89—104 (1950).

Holmes, W., and J. Z. Young: Nerve regeneration after immediate and delayed suture. J. Anat. (Lond.) **77**, 63—96 (1942).

Howell, W. H., and G. C. Huber: A physiological, histological and clinical study of the degeneration and regeneration in peripheral nerve fibers after severance of their connection with the nerve center. J. Physiol. (Lond.) **13**, 22—380 (1893).

Johnson, A. C., A. R. McNabb and R. J. Rossiter: Chemical studies of pheripheral nerve during Wallerian degeneration. 1. Lipids. Biochem. J. **45**, 500—508 (1949).

— — — General review. Chemistry of Wallerian degeneration. Arch. Neurol. Psychiat. **64**, 105—121 (1950).

Krücke, W.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Bd. XIII. Teil 5, S. 19—27. Erkrankungen des peripheren und des vegetativen Nervensystems. Berlin: Springer 1955.

Nishiura, M., N. Harada and T. Imaeda: Electron microscopy of ultrathin sections of lepromatous peripheral nerves. Int. J. Leprosy **25**, 323—328 (1957).

Noback, C. R., and W. Montegna: Histochemical studies of the myelin sheath and its fragmentation products during Wallerian degeneration. J. comp. Neurol. **97**, 211—239 (1952).

Ogura, M., and A. Sato: Studies on the effect of pH of immersion medium on the structure of peripheral nerve with an electronmicroscope. Electronmicr. Jap. **7**, 25—33 (1958).

Palade, G. E.: A small particulate component of the cytoplasm. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 59—68 (1955).

— Endoplasmic reticulum. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl. 4, 85—98 (1956).

—, and P. Siekevitz: Pancreatic microsome. J. biophys. biochem. Cytol. **6**, 671—680 (1956).

Palay, S. L., and G. E. Palade: The fine structure of neurons. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 69—88 (1955).

Ranson, S. R.: Degeneration and regeneration of nerve fibers. J. comp. Neurol. **22**, 487—532 (1912).

Robertson, J. D.: The ultrastructure of adult vertebrate peripheral myelinated nerve fibers in relation to myelogenesis. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 271—278 (1955).

— New observation on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 1043—1047 (1957).

— The ultrastructure of Schmidt-Lantermann clefts and related shearing defects of the myelin sheath. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 39—46 (1958a).

— Structural alteration in nerve fibers produced by hypotonic and hypertonic solutions. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 349—369 (1958b).

Samorajsky, T.: Changes in phosphatase activity following transsection of the sciatic nerve. J. Histochem. Cytochem. **5**, 15—19 (1957).

Speidel, C. C.: Studies of living nerves. J. exp. Zool. **61**, 279—331 (1932).

— Studies of living nerves. Amer. J. Anat. **52**, 1—80 (1933).

Spiegel, E. A.: Die physikalischen Veränderungen der Markscheide im Beginne der Wallerschen Degeneration. Beitr. path. Anat. **70**, 215—220 (1922).

Spielmeyer, W.: Degeneration und Regeneration am peripherischen Nerven. In Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, von Bethe u.a., Bd. 9, S. 285—338. Berlin: Springer 1929.

Takeuchi, I.: Observation of nervous tissue under phase-contrast microscope. J. Kyoto Prefect. Med. Univ. Jap. **60**, 243—260 (1957).

Tashiro, Y., and M. Ogura: Physiochemical studies on the cytoplasmic granules and on the fibrous structure of the cytoplasm. Symp. Soc. Cell Chem. (Jap.) **5**, 17—29 (1957).

Terry, R. D., and J. C. Harkin: Regenerating peripheral nerve sheaths following Wallerian degeneration. Exp. Cell Res. **13**, 193—197 (1957).

Thonburg, W., and E. de Robertis: Polarization and electron microscope study of frog nerve axoplasm. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 475—482 (1956).

Vial, J. D.: The early changes in the axoplasm during Wallerian degeneration. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 551—556 (1958).

Watson, M. L.: Pores in the mammalian nuclear membrane. Biochem. biophys. Acta **15**, 475—479 (1954).

— The nuclear envelope. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 257—270 (1955).

Weiss, P., and H. B. Hiscoe: Experiments on the mechanism of nerve growth. J. exp. Zool. **107**, 315—396 (1948).

—, and A. C. Taylor: Further experimental evidence against "Neurotropism" in nerve regeneration. J. exp. Zool. **95**, 233—257 (1944).

—, and H. Wang: Transformation of adult Schwann cells into macrophages. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **58**, 273—275 (1945).

Young, J. Z.: The functional repair of nervous tissue. Physiol. Rev. **22**, 318—374 (1942).

— Structure, degeneration and repair of nerve fibers. Nature (Lond.) **156**, 132—136 (1945).

Dr. S. Ohmi, 2nd Surgical Division, Kyoto University, Medical School, Konoe, Sakyo, Kyoto (Japan)

Zeitschrift für Zellforschung 54, 68—89 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Horstmann)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SPERMIOHISTOGENESE BEIM MENSCHEN*

Von

E. Horstmann

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Dezember 1960)

Das Spermatozoon ist eine sehr kleine, aber hoch differenzierte Zelle mit vielen einmaligen Sonderbildungen. Durch die hohe Konzentration des haploiden Karyoplasmas, die Ausbildung des Akrosoms, den mächtig entwickelten Bewegungsapparat und die eigentümliche Umbildung der Mitochondrien unterscheiden sich die Spermatozoen nahezu aller Tiere von den übrigen Körperzellen. Die Histologen und neuerdings die Elektronenmikroskopiker haben deshalb immer wieder die eigenartige Struktur der Samenzelle und ihre Histogenese untersucht.

Diese Arbeit behandelt die Spermiohistogenese unter besonderer Berücksichtigung der Bildung des Akrosoms und der Kondensation des Karyoplasmas. Dabei kann ich mich auf einige Arbeiten anderer Autoren, insbesondere auf die Untersuchungen von Ånberg (1957) und Schultz-Larsen (1958) stützen, in deren Monographien die wesentlichen Arbeiten der Lichtmikroskopie und die ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die Struktur der reifen Spermatozoen und ihre Entstehung ausführlich besprochen werden. Von den elektronenmikroskopischen Untersuchungen seien insbesondere noch die Zusammenfassungen von Fawcett (1958), Fawcett u. Burgos (1956) sowie die vergleichenden Studien von Yasuzumi erwähnt.

Nach diesen Untersuchungen stellt sich die Histogenese der Spermatozoen wie folgt dar: Der Spermienkopf besteht nach allgemeiner Ansicht hauptsächlich aus dem sehr dichten Kern; doch werden von Schultz-Larsen nur zwei Drittel des Kerngebietes, die durch eine membranartige Verdichtung abgegrenzt seien, als Nucleus angesehen. Der Kopf ist von einem schmalen Cytoplasmasaum überzogen, der durch eine Zellmembran begrenzt wird. Der vordere abgeflachte Teil des Kernes steckt in einer Kappe, dem Akrosom (Galea capitis). Das aus einem homogenen Material bestehende Akrosom ist vom Kern durch eine dünne Cytoplasmalage getrennt und damit ein Einschluß in dem Cytoplasmaüberzug des Kopfes. Nach Ånberg ist die Akrosommembran dreischichtig, doch schließt dessen Abbildung einen Focusierungsfehler nicht aus. Die Kernkappe ist an der Spitze etwas verdickt. Diese Verdickung kann so stark sein, daß sie in den Kern eingesenkt erscheint. Ånberg hat diese Einsenkung nicht beschrieben, aber er findet im abgeplatteten Teil eine oder mehrere Kernvakuolen.

Weniger intensiv als das reife Spermatozoon ist beim Menschen die Spermiogenese untersucht. Fawcett und Burgos konnten die von Meves schon 1899 erhobenen lichtmikroskopischen Befunde bestätigen, wonach der Golgiapparat an der Bildung des Akrosoms beteiligt ist, und das Cytoplasma sich nach Bildung

* Herrn Prof. Dr. med. et phil. H. Becher zum 65. Geburtstag gewidmet.

des Akrosoms von dem Kopfteil zurückzieht. Auch die Konzentrierung der Mitochondrien im Halsteil bzw. Mittelstück konnten Fawcett u. Burgos im Elektronenmikroskop sicherstellen. Clermont u. Leblond (1955) haben während der Spermiogenese zunächst eine starke PAS-positive Färbung des Akrosoms gefunden, die aber in den letzten Phasen der Reifung besonders beim Menschen ganz zurücktritt. Nach Fawcett entsteht bei der Konzentrierung des Karyoplasma eine körnige Struktur, die dem Chromatin entspricht. Er verfolgt ihre Konzentrierung bis zur reifen Spermatocyte; fädige Strukturen sind dann nach seinen Angaben im Karyoplasma nicht mehr zu erkennen.

Material und Methode

Unser Material stammt von frischen Ejakulaten und von Probeexzisionen, die im Gang von Fertilitätsuntersuchungen in der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Kimmig) anfielen[1]. Dabei wurde ein Teil des Materials lichtmikroskopisch (u. a. PAS-Reaktion) untersucht. Nur solche Proben wurden im Elektronenmikroskop studiert, bei denen nach dem lichtmikroskopischen Befund mit einer normalen Spermiogenese zu rechnen war.

Ejakulat oder Probeexzision wurden frisch in Osmiumtetroxyd in isotonischer, gepufferter 1%iger Lösung bei p_H 7,2 2 Std im Eisschrank fixiert, dann in Methacrylat eingebettet und auf dem Mikrotom nach Porter-Blum oder Fernández-Morán mit dem Glasmesser oder dem Diamanten geschnitten. Die Aufnahmen wurden mit dem Elmiskop I (Siemens) gemacht.

Befunde

Das Akrosom

Das Akrosom wird im Zusammenhang mit dem Golgiapparat in unmittelbarer Nähe des Kernes gebildet (Abb. 1). Der Golgiapparat konzentriert sich, und zwischen dem Golgifeld und dem Kern entsteht eine wenig elektronendichte Vakuole, die etwas körniges oder kurzfädiges Material enthält (Abb. 1) und von ihrer Entstehung an nur durch eine sehr schmale Cytoplasmaschicht von der Kernmembran getrennt ist.

Die Fläche zwischen Kern und Vakuole ist bald so abgeplattet, daß die Vakuole die Kernkontur fortzusetzen scheint (Abb. 2). In ihrem zentralen Teil senkt sich die Vakuole in die abgeflachte Kernoberfläche ein. In dieser Einsenkung verdichtet sich ihr Inhalt zuerst zu dem Aussehen des fertigen Akrosoms (Abb. 3, 4 und 5).

Das Golgifeld besteht aus zahlreichen Lamellen, kleineren und größeren Bläschen, die sich hie und da in die Akrosomvakuole eröffnen. Die Abgabe größerer Mengen dichteren Materials in die Vakuole konnte nicht beobachtet werden. Neben dem Golgifeld findet sich regelmäßig ein sehr elektronendichtes, feinkörniges Material (Abb. 5). Einzelne dieser etwa 180 Å großen Granula können der Akrosommembran anliegen. Ob diese Körnchen in die Vakuole übertreten, konnte ich nicht entscheiden.

Sobald die Kopfkappen-Vakuole erscheint, tritt im elektronenoptischen Bild die der Vakuole zugekehrte abgeflachte Kernmembran stärker hervor. Sie wird dichter als die übrige Kernmembran und läßt den Kern-Cytoplasmaspalt nur gerade eben noch erkennen. Er ist dann besonders schmal (120 Å). Die feine

[1] Herrn Doz. Dr. C. Schirren danke ich für die Überlassung des Materials und der klinischen Untersuchungsergebnisse.

Cytoplasmaschicht zwischen Kern und Akrosomvakuole ist nur 250—400 Å dick und erscheint dichter als das übrige Cytoplasma der Spermatide.

Die hohe elektronenoptische Dichte der Kernmembran an der ganzen Kontaktfläche ist zum Teil durch die Anlagerung der im Karyoplasma vorhandenen

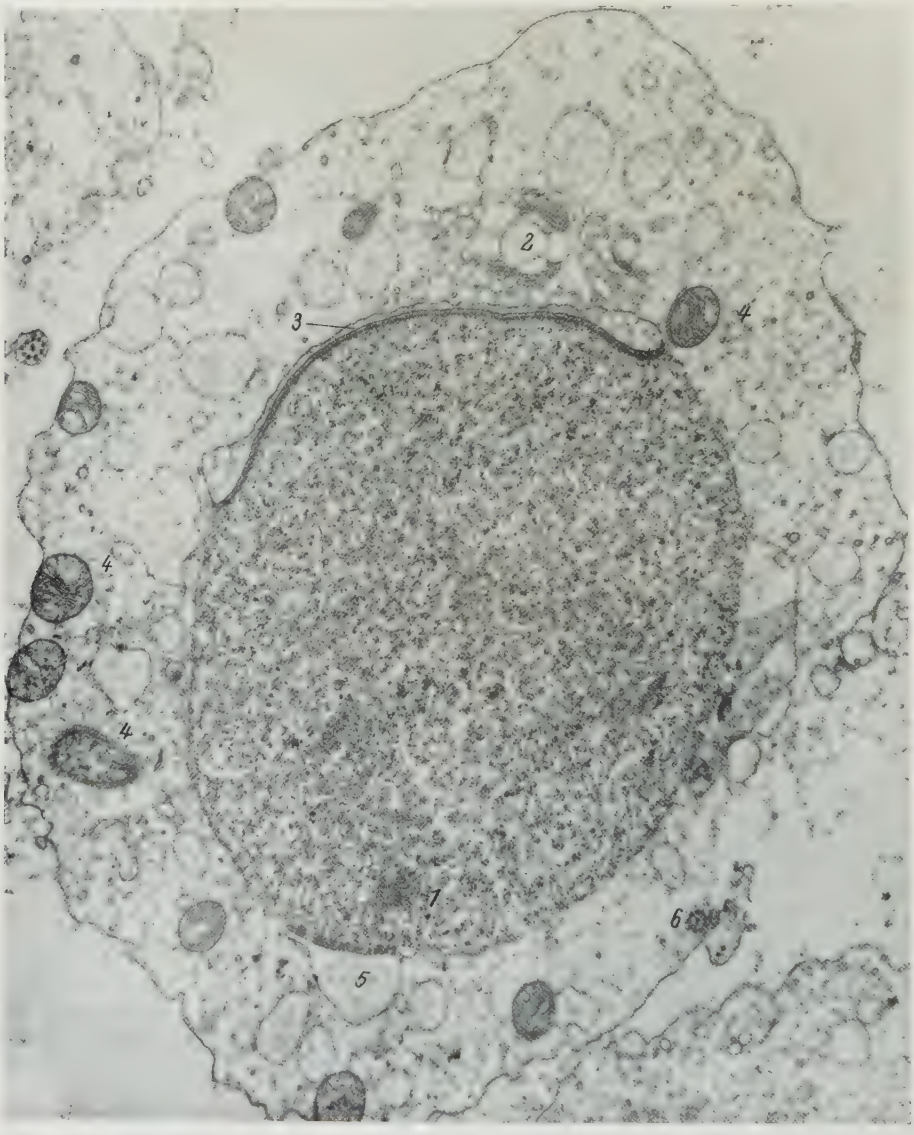


Abb. 1. Junge Spermatide. *1* Nucleolusartige Verdichtung des Karyoplasma, *2* Golgiapparat, *3* Akrosomvakuole, *4,4* Mitochondrien, *5* Lamellenkörper in Bildung, *6* Querschnitt durch die Geißelstruktur. Vergr. 17500fach

Körnchen bedingt (Abb. 2). Die Körnchen sind hier oft in Reihen angeordnet, die zur Membranebene senkrecht stehen.

Mit fortschreitender Differenzierung wird die anfänglich halbkugelige Akrosomvakuole abgeflacht; dabei bildet sich die ursprünglich abgeplattete Kontakt-

fläche mehr und mehr durch den sich wieder abrundenden Kern zur Kalottenform um (Abb. 5). Die so entstehende Kappe umschließt zunächst nur $^1/_4$ oder $^1/_5$ des ellipsoiden Kernes. Während und nach der Abflachung verdichtet sich

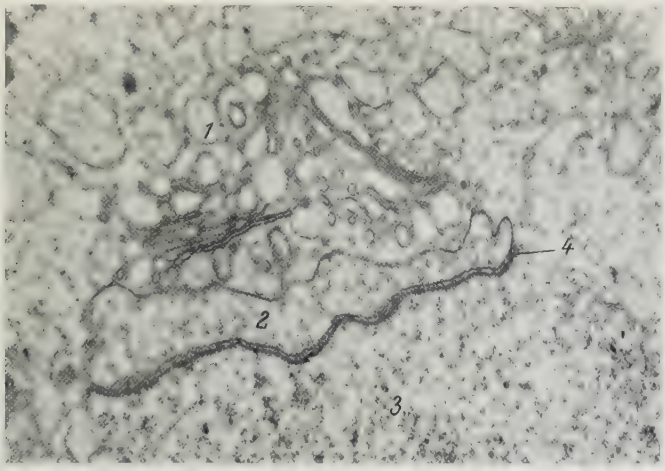


Abb. 2. Golgiapparat (*1*) und Akrosomvakuole (*2*) einer jungen Spermatide. *3* Karyoplasma, *4* schmaler Cytoplasmasaum zwischen Kern und Akrosomvakuole. Beachte die Verdichtung der Kernmembran im Bereich der Vakuole. Vergr. 30000fach

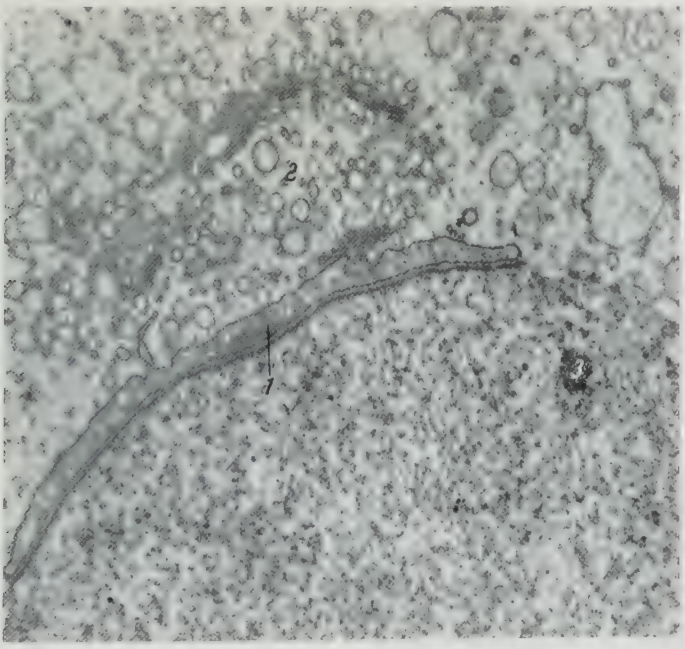


Abb. 3. Beginn der Akrosombildung (*1*) in der Akrosomvakuole. *2* Golgiapparat, *3* Verdichtung des Karyoplasma. Vergr. 22000fach

der Inhalt der Akrosomvakuole zu der feinkörnigen, fast homogenen dichten Struktur, die man auch beim reifen Spermatozoon findet. Dabei treten zahlreiche Bläschen im Spermatidencytoplasma an der Oberfläche des Akrosoms auf (Abb. 6).

Golgifeld und Mitochondrien wandern seitlich am Kern vorbei und das Cytoplasma zieht sich bis auf einen schmalen Saum von der Kopfspitze zurück. Die Bewegungen des Zellinhalts sind noch dadurch kompliziert, daß sich das Akrosom während seiner Bildung von apikal nach basal verschiebt (Clermont u. Leblond 1955). Die Akrosombildung beginnt nämlich in der Regel an dem zur

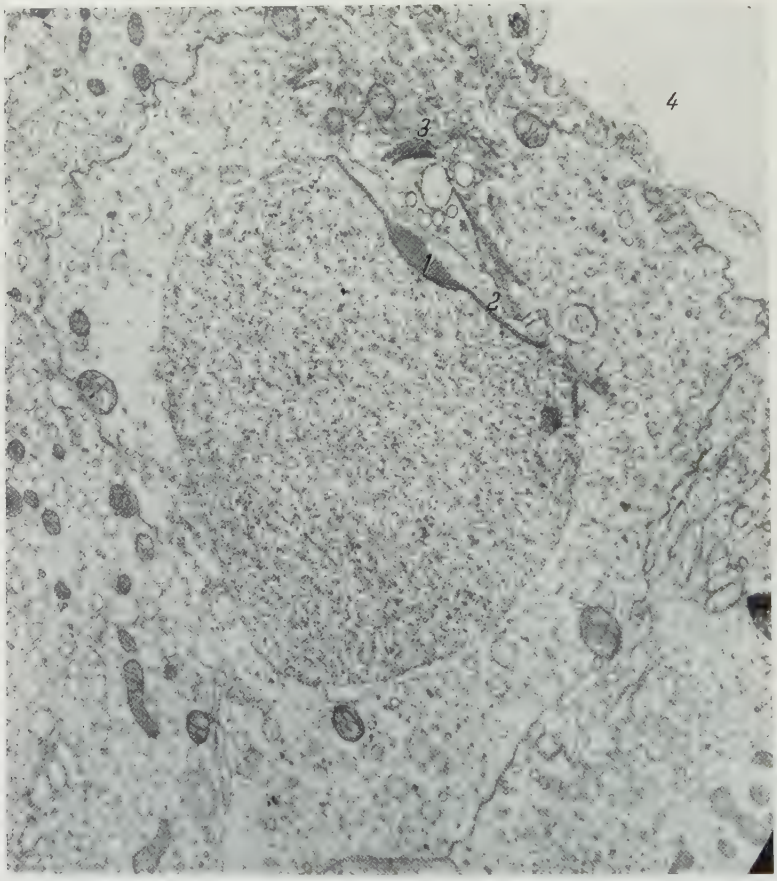


Abb. 4. Akrosombildung (*1*) im eingedellten Zentrum der Akrosomvakuole (*2*). *3* Golgiapparat. Die Akrosomvakuole liegt auf der zur Lichtung des Hodenkanälchens (*4*) hingewendeten Seite des Kernes. Vergr. 12 000fach

Lichtung des Hodenkanälchens gerichteten Umfang des Spermienkernes, während die Kopfspitze des reifen Spermatozoon zur Basis des Tubulusepithels gerichtet ist. Man findet denn auch an einigen Spermatiden die Akrosombildung neben — nicht gegenüber — den Strukturen des Hals- und Mittelstückes. Die Polarisierung der Spermatide erfolgt möglicherweise durch eine Rotation des Kernes mit dem Akrosom um annähernd 180°.

Mit fortschreitender Reifung der Spermatide greift das Akrosom immer weiter um das Karyoplasma und umfaßt schließlich die Hälfte des Kernes. Dabei ist der freie Rand des Akrosoms zu einem Randwulst aufgetrieben, dem schwanzwärts einige cytoplasmatische Vakuolen angelagert sein können, die in späteren

Stadien mit dem Randwulst wieder verschwinden. Die Akrosomkappen fast reifer Spermatozoen und der reifen Spermien im Ejakulat sind in den elektronenmikroskopischen Abbildungen meist etwas gewellt (Abb. 13).

Nach dem Rückzug des Spermatidencytoplasma von der Kopfspitze verbleibt nur noch ein sehr dünner Cytoplasmasaum um das Akrosom. Da sich dann das

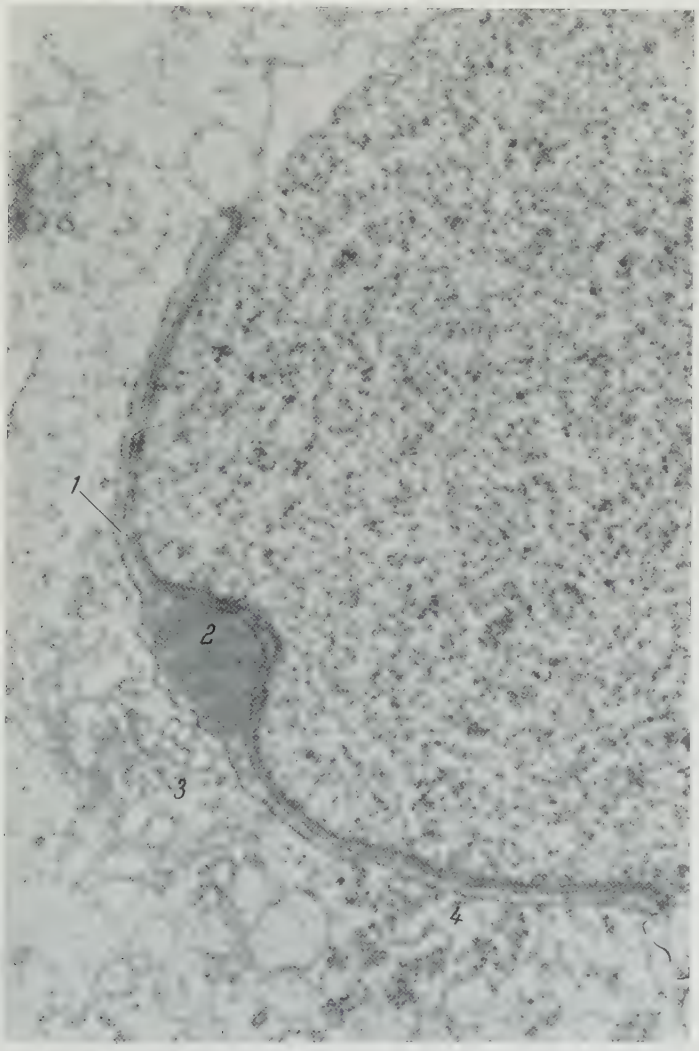


Abb. 5. Rückbildung der Akrosomvakuole (*1*). Das Akrosom (*2*) ist in den Kern eingedellt. *3* Golgiapparat, daneben feine, elektronendichte Granulation (*4*). Vergr. 28 000fach

Cytoplasma der Sertoli-Zellen dem Spermatozoonkopf eng anlegt, entsteht hier eine Schichtenfolge von Membranen verschiedener Herkunft (Abb. 18). Der von 2 Membranen begrenzte Kernplasmaspalt ist 120 Å weit. Der innere Cytoplasmaüberzug des Akrosoms ist 200—400 Å, der äußere nur 120—140 Å dick. Das von einer einfachen Membran umhüllte Akrosom hat an den seitlichen Partien eine Stärke von 400—600 Å und die Zellmembranen der Spermatiden und

der Stützzelle sind durch einen 150—200 Å breiten Spalt getrennt. Inneres und äußeres Blatt der cytoplasmatischen Umhüllung des Akrosoms sind bei den reifen

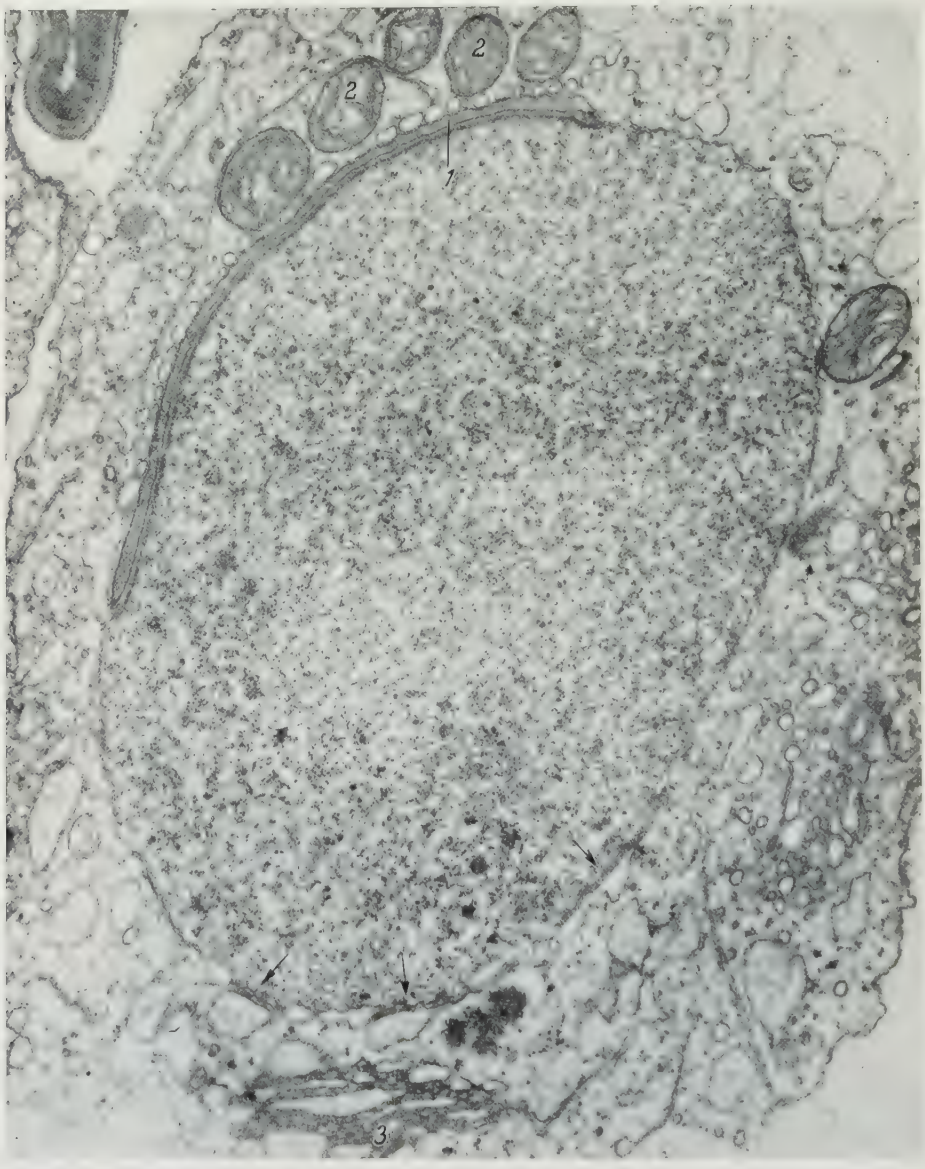


Abb. 6. Das Akrosom (*1*) ist von einer Membran umgeben, der nach außen Cytoplasmabläschen aufliegen. *2* Mitochondrien, *3* Lamellenkörper, zum Teil in Delamination von der Kernoberfläche (↑↓). Vergr. 23 000fach

Spermatozoen unregelmäßig erweitert (Abb. 13). Die geringe Elektronendichte der Erweiterungen läßt eine Quellung der Blätter vermuten.

Die als „Becherhülse" beschriebene Struktur um das kaudale Ende des Spermienkernes ist im Elektronenmikroskop nicht zu finden.

Das Karyoplasma

Die lichtmikroskopisch festgestellte Chromatin-Kondensation während der Spermiohistogenese läßt sich im Elektronenmikroskop in verschiedene Phasen

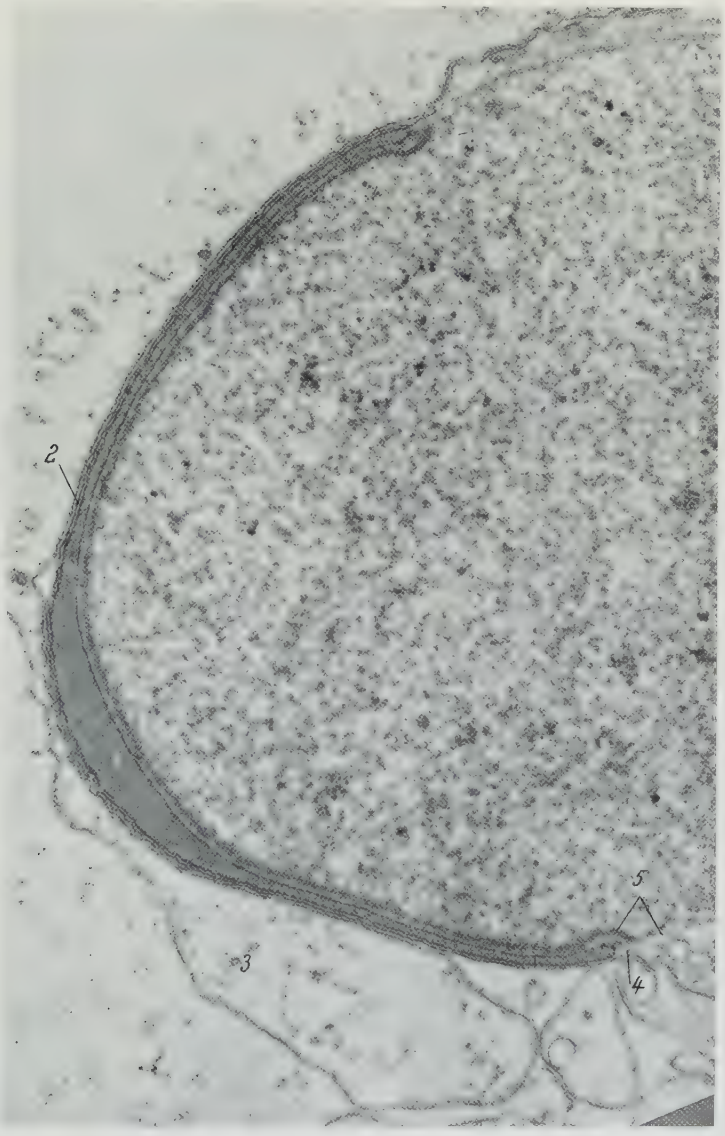


Abb. 7. Das Akrosom (*1*) ist nur noch von einem schmalen Cytoplasmasaum (*2*) überzogen, dem sich ein Fortsatz einer Sertoli-Zelle (*3*) aufgelagert hat. Am hinteren Rand des Akrosoms (*4*) ist dessen Einbettung in den Cytoplasmaüberzug des Kernes zu erkennen. *5* Kernmembran. Vergr. 32 000fach

unterteilen, wodurch es möglich wird, die einzelnen Bilder chronologisch einzuordnen.

1. Phase. Vor der Ausbildung der Kopfvakuole ist das Karyoplasma locker (Abb. 1—7). Es enthält feine dichte Körnchen, die häufig auf weniger dichten,

oft spiralig gewundenen Fäden aufgereiht zu sein scheinen. Ein Nucleolus fehlt, wie schon die Lichtmikroskopie zeigt. Es kommen aber wohl in allen jungen

Abb. 8. Das Akrosom (*1*) ist nach außen von 3 Membranen bedeckt: der Akrosommembran und den beiden Zellmembranen der Spermatide und der Sertoli-Zelle. Der Kernmembran (*2*) sitzen innen gröbere Körnchen auf, während das übrige Karyoplasma noch feinkörnig ist. Am kaudalen Kernumfang hat sich das körnige Material von der Kernmembran etwas zurückgezogen. ↑↑ Bildung von Lamellenkörpern, *3,3* Material der „Schwanzmanschette", *4,4* Bläschen im Cytoplasma der benachbarten Sertoli-Zellen. Vergr. 31 000fach

Spermatiden bis zu 0,3 μ große Ansammlungen körnigen Materials vor, deren Struktur derjenigen des Nucleolus anderer Kerne gleicht (Abb. 1, 3, 4). Auch

die mehr oder weniger stark gewundenen Körnchenketten fehlen nicht, die auf kaum sichtbaren Fäden aufgereiht sind. Damit ergibt sich das Bild des Karyoplasma, das schon mehrfach für den Interphasenkern beschrieben wurde (Horstmann u. Knoop 1957). Für diese Ausgangsphase ist außerdem charakteristisch,

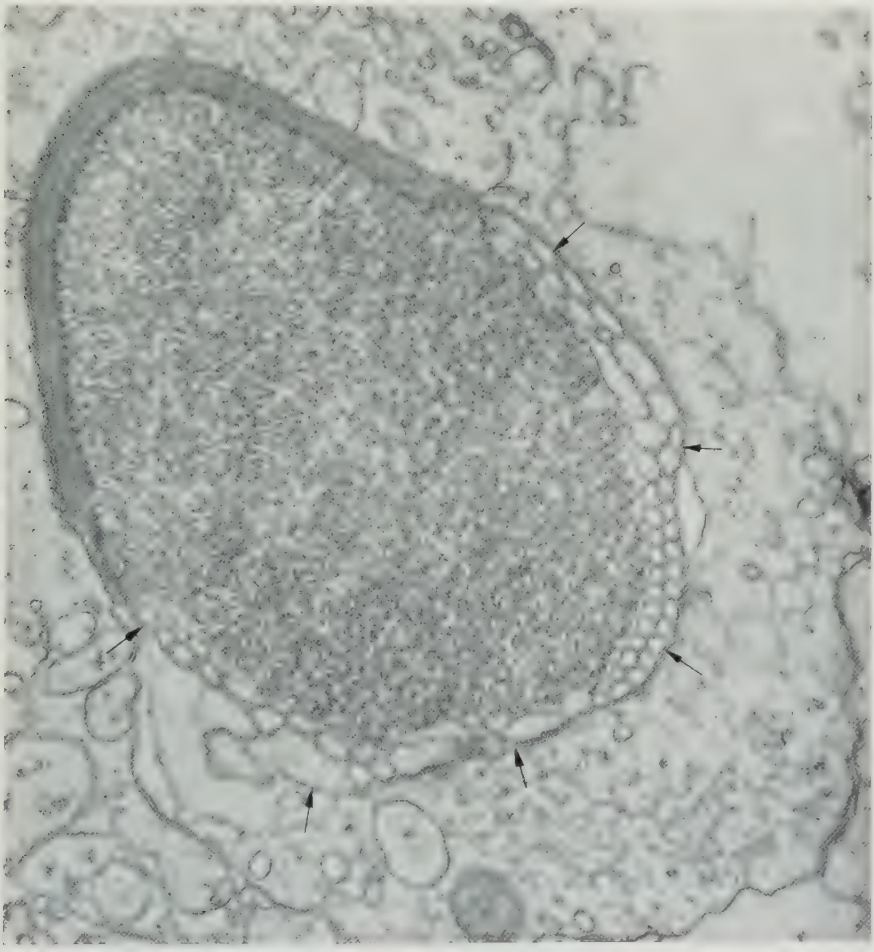


Abb. 9. Das Karyoplasma ist dicht mit feinen Körnchen besetzt. Der Kernmembran liegen im Bereich des Akrosoms gröbere Granula an. Im kaudalen Kernbereich zahlreiche Vakuolen. ↑↑ Kaudale Kernmembran. Vergr. 31 000fach

daß relativ viel fädiges, oder wenig elektronendichtes Material vorhanden ist, daß also die dichteren Körnchen weit zerstreut sind.

Sobald die Akrosomvakuole erscheint, verdichtet sich — wie schon erwähnt — die Kernmembran des abgeflachten Teiles (Abb. 2, 3, 5, 7). Das Karyoplasma behält aber noch das gleiche Aussehen. Bei einigen Spermatiden erscheint es etwas gleichmäßiger verteilt und die kleinen Ansammlungen körnigen Materials verschwinden.

Sobald das Akrosom kappenförmig wird und das Cytoplasma von der Kopfspitze zurücktritt, wird der ganze Kerninhalt gleichmäßig körnig, das fibrilläre

Material tritt mehr zurück, und die der Kopfkappe benachbarte Kernmembran wird von den Granula dichter besetzt (Abb. 7). Die mittlere Körnchengröße beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 180—200 Å.

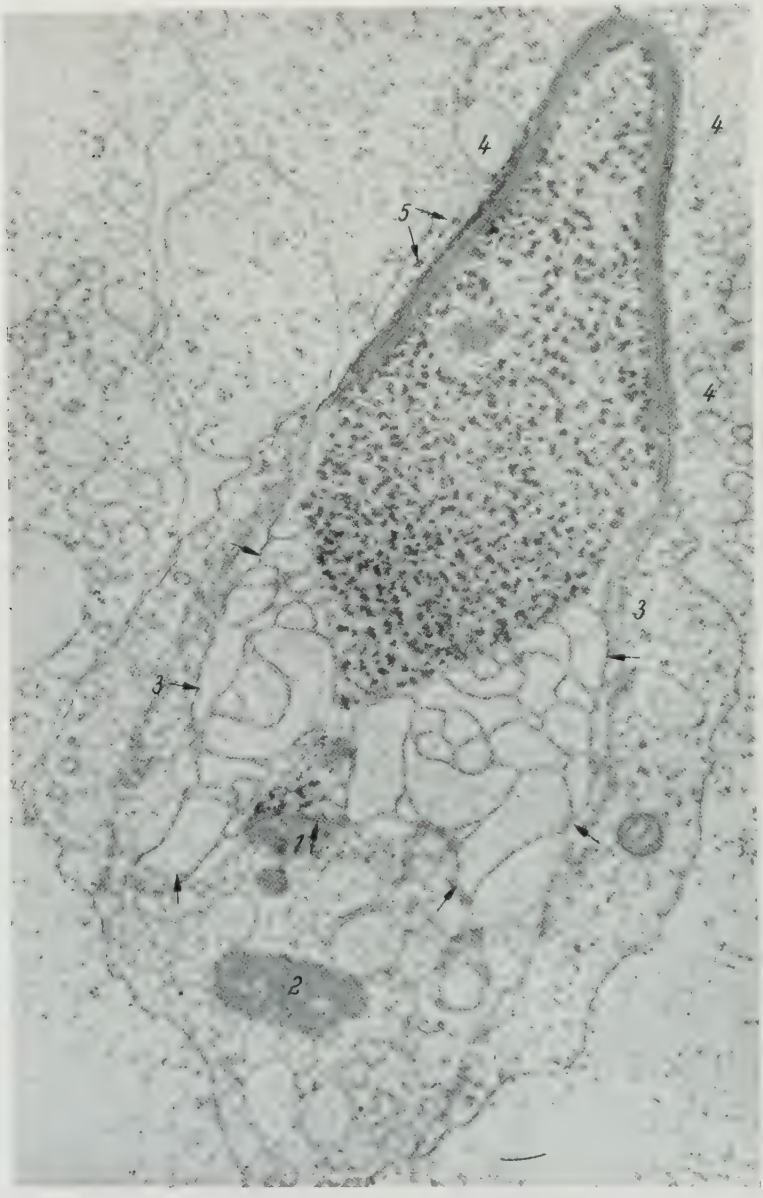


Abb. 10. Vergröberung der Körnchen im Karyoplasma. Sackartige Erweiterung der kaudalen Kernpartie durch zahlreiche große Vakuolen. ↑↑ Kaudale Kernmembran. *1* Zentrales Centrosom in Kontakt mit der Kernmembran, *2* mittleres Centrosom, *3,3* streifiges Material der Schwanzmanschette, *4,4* Bläschen und Körnchen (*5*) im benachbarten Cytoplasma der Sertoli-Zelle. Vergr. 18500fach

Die *2. Phase* ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Anlagerung von groben Körnchen an der Kernmembran im Bereich der Kernkappe (Abb. 8). Die groben

Körnchen haben einen Durchmesser von etwa 600—800 Å. Das körnige Material des übrigen Karyoplasmas wird nun immer dichter, d.h. die Körnchen rücken mehr und mehr zusammen, während im kaudalen Kernbereich viele Vakuolen entstehen (Abb. 9).

In der *3. Phase* werden die Karyoplasmagranula im ganzen Kerngebiet vergrößert (Abb. 10). Die etwa 200 Å dicken Körnchen verschwinden nach und

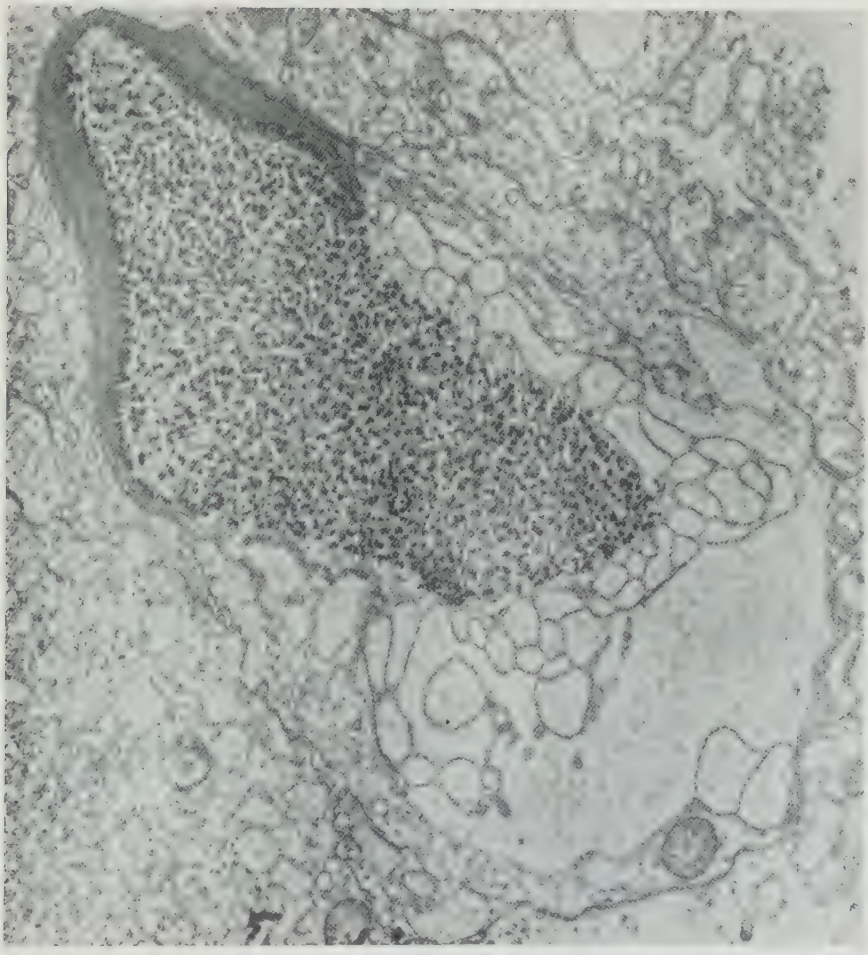


Abb. 11. Die Körner im Karyoplasma sind enger zusammengerückt als in Abb. 10. Einige der großen Vakuolen liegen jetzt im Cytoplasma. Der Verlauf der Kernmembran ist nicht sicher zu bestimmen. Vergr. 20000fach

nach und an ihrer Stelle liegen Körnchen von etwa 650—700 Å (Abb. 10). Die groben Körnchen sind zunächst etwas lockerer, rücken dann aber immer näher zusammen (Abb. 11 und 12). Schließlich ist das gesamte körnige Material bis auf schmale Aussparungen eng zusammengebacken (Abb. 13). Gleichzeitig werden die Vakuolen im kaudalen Kernbereich sehr viel größer. Während dieser Konzentrierung können unregelmäßig abgegrenzte, vakuolenartige Bildungen mitten in der Kernsubstanz auftreten oder größere Ansammlungen von weniger dichter

Zwischensubstanz entstehen (Fawcett 1958). Im Endstadium dieser Phase besitzt der Kern der Spermatide die morphologischen Eigenschaften der im Ejakulat auftretenden Spermatozoen. Während der beiden letzten Phasen der Konzentration bilden sich in dem caudalen Kernabschnitt viele besonders große Vakuolen aus.

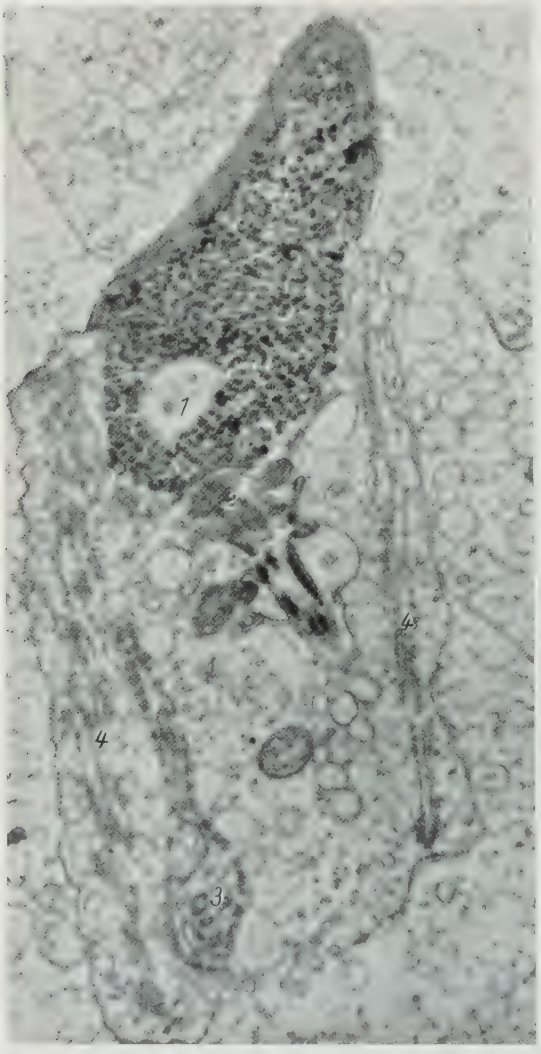


Abb. 12. Die Körner des Karyoplasma liegen noch enger als in Abb. 11. Zwischen ihnen ist eine Vakuole aufgetreten (*1*). *2* Centriolenkomplex, *3* Rest des Lamellenkörpers, *4,4* Schwanzmanschette. Vergr. 23000fach

Die Konzentration des Karyoplasmas erfolgt unter starker Verkleinerung des Spermatidenkernes. Daraus folgt, daß das Chromatin wirklich konzentriert und nicht vermehrt abgelagert wird. Eine mäßige Zunahme der Chromatinsubstanz ist allerdings elektronenmikroskopisch weder auszuschließen noch nachzuweisen.

Die Stoffabgabe des Kernes

Während der Konzentration des Kernmaterials treten elektronenmikroskopisch nachweisbar Stoffe aus dem Kern aus. Schon die frühe Spermatide, deren Karyoplasma noch keinerlei besondere Differenzierung zeigt (unsere Phase 1), gibt in auffallender Weise Material an das umgebende Gewebe ab (Abb. 14). An den Abgabestellen treten in auffallend regelmäßigen Abständen Kernmembranporen auf, die von einer dichten Substanz ausgefüllt sind. Aus dem Vergleich vieler Bilder dieser Regionen ergibt sich, daß die so veränderten Kernplasmazonen durch Bildung eines neuen Kernplasmaspaltes lamellenartig vom Kern her abgehoben und in mehreren Blättern übereinander geschichtet werden (Abb. 14). Dieser Vorgang entspricht der Bildung des Ergastoplasmas in anderen Zellen (Baud 1959). Da auch bei der Spermatide Lamellen mit zwischengelagerter Kernsubstanz und solche ohne nennenswerte Zwischensubstanz auftreten, steht ihrer Deutung als Ergastoplasma nur der Unterschied in den Palade-Granula entgegen. An deren Stelle findet sich nämlich in dem

Lamellensystem eine verwaschen erscheinende Substanz, die auch nicht wie die Palade-Körnchen, den Lamellen direkt aufsitzt, sondern unregelmäßig zwischen den Lamellen liegt (Abb. 15). Die Lamellenstrukturen entfernen sich mehr und mehr in kaudaler Richtung vom Kern. Dabei erweitern sich die optisch leeren

Abb. 13. Nahezu reife Spermatide. *1,1* Schnittfalten (Artefakte), *2* gewelltes Akrosom im erweiterten Cytoplasmaüberzug des Kopfes, *3,3* aus dem Kern ausgeschleuste und teilweise kollabierte Vakuolen. Vergr. 34000fach

Spalten, die dem Kern-Cytoplasmaspalt entsprechen, zu teilweise bizarren Blasen, in denen eine etwas faserige Substanz auftritt.

Man findet diese Strukturen schon bei sehr jungen Spermatiden, bei denen die Kopfkappenbildung eben erst das Stadium der Akrosomvakuole erreicht. Dann liegen sie aber oft neben der Akrosomvakuole mitten im Cytoplasma, oder ihre Bildung findet gerade am Rande der Vakuole statt.

Die Neubildung dieser Lamellenkörper konnte ich bis zum Beginn der 2. Phase der Kernkondensation verfolgen; in der 2. Phase wandern sie weit in das kaudale Cytoplasma ab (Abb. 15), und die Stoffabgabe aus dem Kern erfolgt nach einem anderen Modus:

Im kaudalen Karyoplasma entstehen oft schon gegen Ende der 2. Phase Vakuolen. Die dichten Körnchen rücken dort von der Kernmembran in das Kerninnere ab. Die Region der Vakuolen enthält jetzt fast nur noch das weniger dichte Kernmaterial (Abb. 9). Aber die Vakuolen bleiben größtenteils innerhalb der Kernmembran liegen, die hier sehr weit aufgetrieben sein kann. Auf vielen

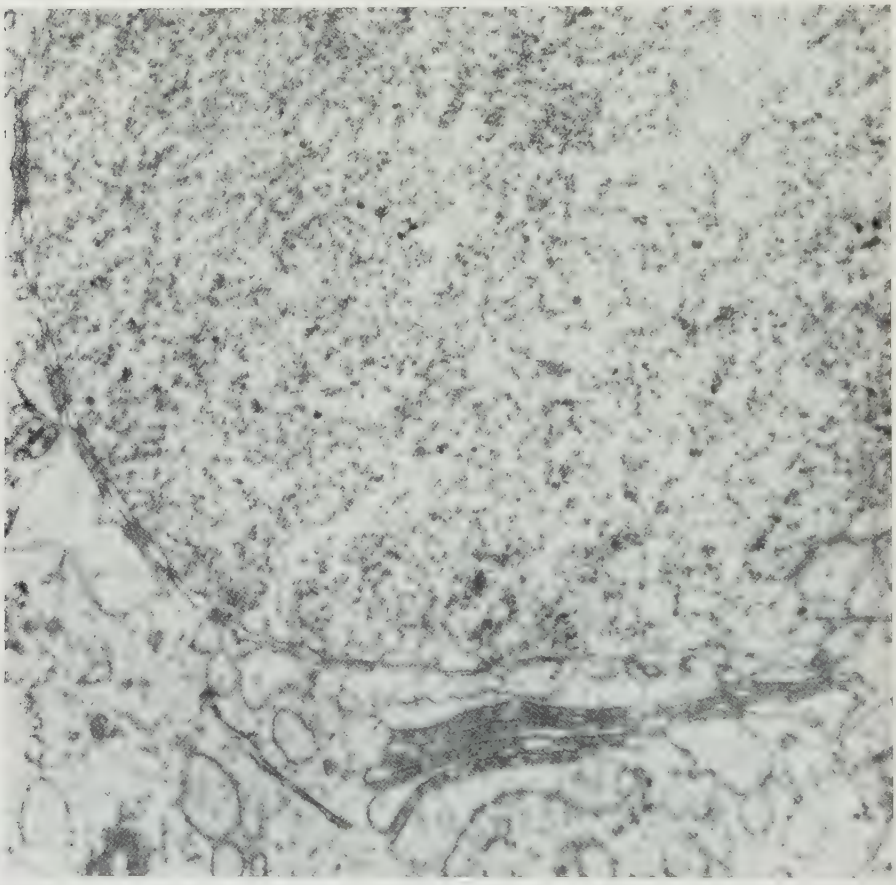


Abb. 14. Junge Spermatide. Mit elektronendichtem Material gefüllte Kernporen (linker Bildrand) und Lamellenkörper (unten). Vergr. 16000fach

Bildern der Phase 3 hat man den Eindruck, als hinge die Kernmembran wie ein mit Flüssigkeitsvakuolen prall gefüllter Sack an dem von dichtem Chromatin vollgepackten Kopfende (Abb. 10, 11). Wie lebhaft die Vakuolen offenbar gebildet werden, zeigen Bilder aus der Phase 2, die mehrere Reihen von kleinen übereinanderliegenden Kernvakuolen wiedergeben (Abb. 9).

Die großen flüssigkeitsgefüllten Räume innerhalb des Kernes imponieren im Lichtmikroskop als eine gemeinsame Kernvakuole, die mehrfach beschrieben worden ist. Sie verschwindet im Laufe der letzten Reifungsphase wieder. Wie das geschieht, konnte ich an meinem Material bislang nicht mit Sicherheit feststellen. Vermutlich werden die Vakuolen dadurch vom übrigen Kernmaterial gesondert, daß sich nahe dem konzentrierten Karyoplasma eine neue Kernmem-

bran bildet, und die Vakuolen damit zunächst in das Cytoplasma abgegliedert werden (Abb. 13), wo sie dann ihren Inhalt abgeben und kollabieren.

Während sich das Cytoplasma in der Endphase der Chromatinkondensation kaudal vom Kern zum späteren Mittelstück verlängert, erscheint im Lichtmikroskop eosinophiles Material, das sich in Form eines Zylindermantels vom größten Kernumfang nach hinten erstreckt („Schwanzmanschette" Meves 1899). Im Elektronenmikroskop findet sich in derselben Ausdehnung Material mittlerer Dichte (Abb. 8, 10, 12), das den Kern umgibt, soweit er nicht vom Akrosom bedeckt ist oder die großen Vakuolen enthält. In streifigen, gerade verlaufenden Zügen erstreckt sich das Material vom hinteren Ende der Kernkappe bis in das kaudale Ende der Spermatide. An Tangentialschnitten gewinnt man den Eindruck, daß es dem Kern entstammt und vom Kern aus mit dem Cytoplasma nach kaudal rückt. Oft scheint es aus feinen Bläschen und Lamellen zu bestehen. Die kaudalsten Anteile verlieren sich im Cytoplasma. Herkunft und Bedeutung dieser Struktur sind ungeklärt.

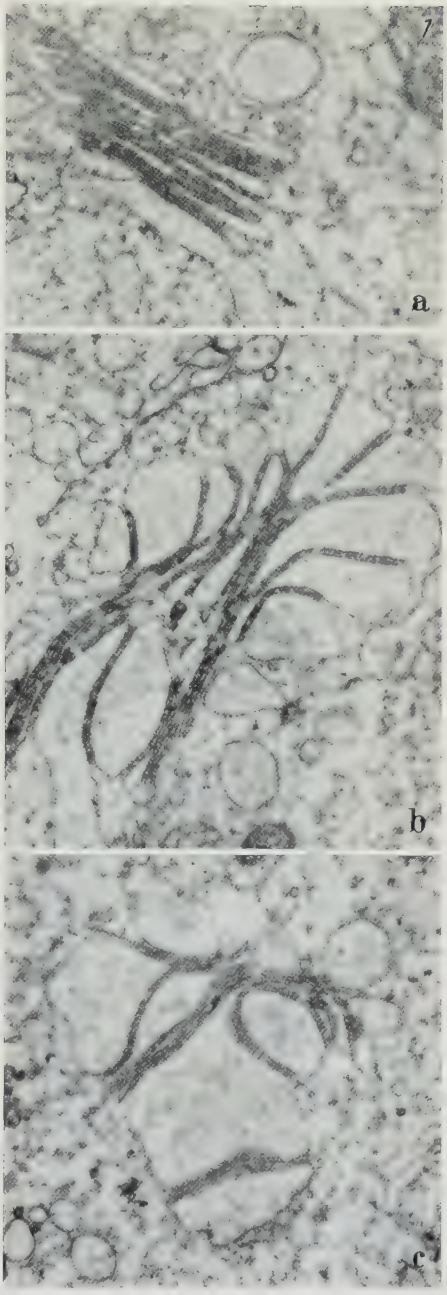


Abb. 15a—c. Lamellenkörper aus verschiedenen Spermatiden. a Der Lamellenkörper ist noch nicht blasig verändert. *1* Karyoplasma und Neubildung von Lamellen. b u. c Blasige Erweiterungen der dem früheren Kern-Cytoplasmaspalt entsprechenden Lamellenlagen. Vergr. a u. b 20000fach, c 22000fach

Auf die Differenzierung des Hals- und Mittelteiles sowie des Schwanzes soll in dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Ich möchte nur noch kurz auf die Verankerung des Bewegungsapparates hinweisen. An Längs- und Querschnitten sieht man, daß die Wurzel des Fibrillenapparates durch ein aus mehreren Fibrillen aufgebautes Seitenstück verlängert ist (Abb. 16). Entsprechend der geringen Wahrscheinlichkeit, diesen seitlichen Fortsatz zugleich mit dem Schwanz auf einem Schnitt zu erfassen, ist dieser Befund nur selten zu erheben. Wie Fawcett und Porter (1954) gezeigt haben, kommen derartige Fortsätze regelmäßig an den Basalkornstrukturen bestimmter Flimmerhaare bzw. beim Flimmerepithel des

Froschpharynx vor. An der Verankerung des Bewegungsorganells der Spermatozoen sind sie noch nicht beschrieben. Hier ist ihre Struktur sehr viel komplizierter. Meves hat auch dieses Detail offenbar schon gesehen. Er beschreibt und zeichnet ein feines Fädchen, das vom proximalen Zentralkörper seitlich absteht und später verschwindet.

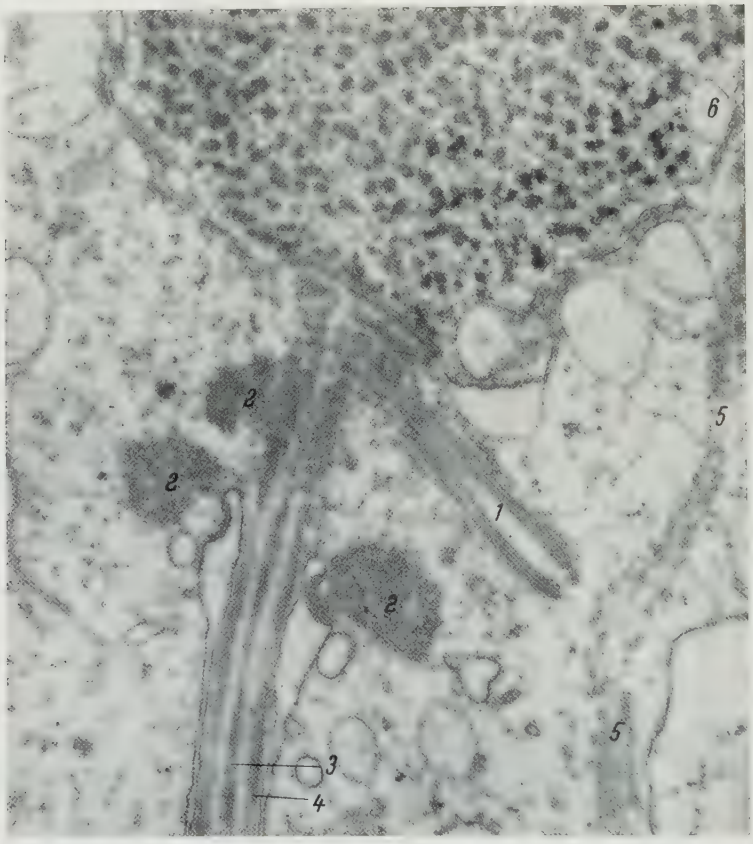


Abb. 16. Verankerung des Schwanzes. Beachte die Ausbildung der Kernmembran an der Verankerungsstelle. In die Segmentierung der Schwanzwurzel greift der seitliche Fortsatz (*1*) ein, der aus mehreren Fibrillen besteht. *2,2* Centriolenmaterial, *3* Achsenfilamente, *4* Randfilamente des Schwanzes, *5* Schwanzmanschette, *6* beginnende Vakuolenbildung im Karyoplasma. Vergr. 40 000fach

Die Sertoli-Zellen während der Spermiohistogenese

Die jungen Spermatiden sind nur unvollständig von den Sertoli-Zellen umfaßt. Das Cytoplasma der Sertoli-Zellen enthält, soweit es mit den Spermatiden Kontakt hat, viele Bläschen, von denen einige mit Palade-Körnchen besetzt sind, reichlich Mitochondrien und einige sehr dichte Einschlüsse. Die meist mehr basal gelegenen Einschlüsse sind zum Teil kugelig bis ellipsoid und bestehen dann aus einer körnigen Substanz. Andere sind unregelmäßig begrenzt, besitzen eine dichtere Außenschicht und erscheinen in ihrem Inneren homogen (Abb. 17). Zahl und Größe der Einschlüsse sind sehr variabel; oft sieht man sie gar nicht.

Sobald sich das apikale Cytoplasma der Spermatide zurückgezogen hat, ordnet sich das Sertoli-Plasma um die Spermatide; jetzt erscheinen Bläschen und eine

feine körnige Substanz großer Dichte im Grenzgebiet des Sertoli-Cytoplasmas (Abb. 8, 10). Die Bläschen sind teilweise mit wenigen Körnchen (Ergastoplasma) besetzt. Eine Zunahme der Mitochondrien in der Nachbarschaft der Spermatiden ist nicht zu beobachten. Die Anordnung der Bläschen und Granula um die Spermatide spricht für einen Stoffaustausch zwischen der jungen Samenzelle und ihrer „Ammenzelle" (Bargmann 1959). Nach der Reifung der Spermatiden sind sie verschwunden (Abb. 13).

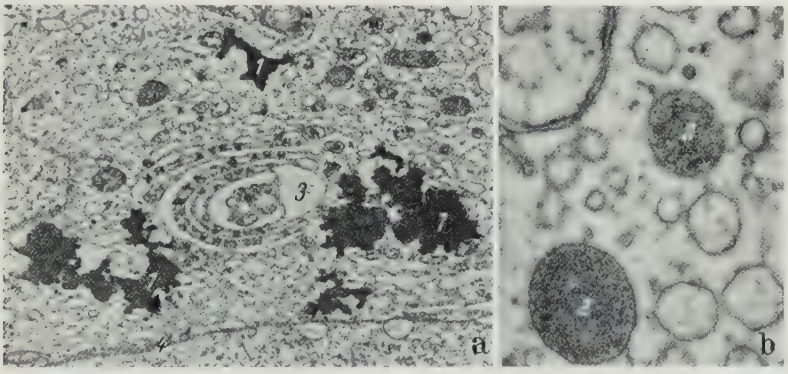


Abb. 17 a u. b. Ausschnitte aus dem Cytoplasma von Sertoli-Zellen. a Unregelmäßig begrenzte Einschlüsse (*1,1*), *3* Ergastoplasma, *4* Zellgrenze. b Die kugeligen Einschlüsse (*2,2*) sind von einer Membran umgeben. Vergr. a 11 000fach, b 26 000fach

Besprechung der Befunde

Das Akrosom bietet zu Beginn seiner Bildung eine deutliche PAS-positive Reaktion und zeichnet die Kopfkappe zunächst sehr scharf. Gegen Ende der Spermiohistogenese wird die Reaktion deutlich schwächer (Clermont u. Leblond), wovon ich mich auch an eigenen Präparaten überzeugen konnte. Der elektronenmikroskopische Befund bleibt indessen unverändert. Eine tiefgreifende chemische Umwandlung der Akrosomsubstanz würde sich vermutlich auch im elektronenmikroskopischen Bild zeigen. Ich halte es deshalb für wahrscheinlich, daß das Akrosom nach wie vor der Änderung seiner mit der PAS-Reaktion faßbaren histochemischen Eigenschaften Polysaccharide enthält. Wada, Collier u. Dan (1956) sowie Colwin, Colwin u. Philpott (1957) haben bei Wirbellosen morphologisch nachgewiesen, daß das Akrosom durch die Eihaut hindurch einen Kanal für den Eintritt der Spermie auflöst. Die Autoren halten es aber für möglich, daß die Funktion des Akrosoms damit noch nicht erschöpft ist.

Die Abflachung der Kernoberfläche durch die Akrosomvakuole kann nicht dadurch zustande kommen, daß die Vakuole gegen den Kern gepreßt wird, da sonst die gesamte Form der Vakuole Zeichen eines solchen Druckes aufweisen würde. Die Abflachung der Kontaktfläche könnte durch Veränderungen der Oberflächenspannung der Kern-Cytoplasmamembran im Bereich der Akrosomvakuole bedingt sein. Der extrem dünne Kern-Cytoplasmaspalt in diesem Bereich spricht dafür, daß hier besondere Verhältnisse vorliegen, die auch auf das Kernmaterial einwirken; denn im Bereich des Akrosoms eilt die Kondensation des Karyoplasmas, insbesondere die Bildung der groben Granula dem Kondensationsvorgang im übrigen Karyoplasma voraus.

Um die Konzentrierung des Kernmaterials schärfer zu erfassen, habe ich versucht, die Bildung der Kerngranulation genauer zu bestimmen. Die Messung der Körnchengröße ist deshalb schwierig, weil die Granula in unseren Bildern nicht sehr scharf begrenzt sind und sich häufig überlagern. Die Ungenauigkeit der einzelnen Messungen haben wir dadurch eingeengt, daß wir je 100 Körnchen ausgemessen und die Werte in einer Summenprozentkurve aufgetragen haben (Abb. 18). Wie die Kurve zeigt, ergibt sich für die einzelnen Phasen ein bestimmtes Bild der Mengenverteilung. In der Phase 1 liegt die Größe der Körnchen zwischen 140—240 Å. Gegen Ende des Kondensationsvorganges waren die Körnchen im

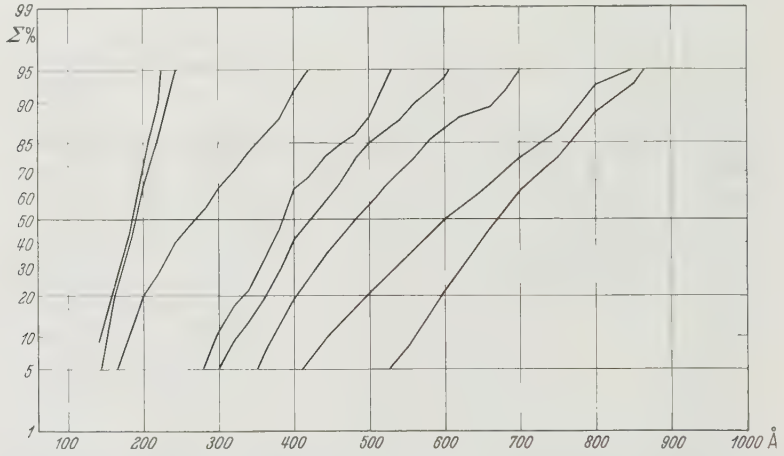


Abb. 18. Summenprozentkurven der Durchmesser von je 100 Karyoplasmakörnchen aus 8 Spermatiden mit unterschiedlicher Chromatinkonzentration. Der Wert bei 50 % entspricht dem Durchschnittswert

Durchschnitt bis auf 660 Å angewachsen. Dazwischen streuen die Werte sehr stark, weil dann die Vergrößerung der Granulation erfaßt ist, also noch kleine und schon große Granula vorhanden sind. Wenn die Körner in der letzten Phase enger zusammenrücken, ist eine Größenbestimmung nicht mehr möglich. Nebel, Tyler und Murphy (1959) haben die Körnchengröße in späten menschlichen Spermatiden mit einer anderen statistischen Methode ermittelt und als Durchschnittswert 500 Å gefunden.

Auf welche Bestandteile des Karyoplasmas sind nun die Körnchen zu beziehen? In anderen Interphasenkernen sieht man feine Körnchen auf schwach osmiophilen, häufig parallel und mehr oder weniger spiralig verlaufenden Fäden aufgereiht. Die gleichen Bilder zeigen auch junge Spermatiden der Phase 1. Die Körnchen sind in Analogie zum Chromosomenbau als Chromatinmaterial (DNS) gedeutet worden, das auf den Chromonemata gelegen ist. Die Konzentrierung der feinen Körnchen zu den groben ist aus dem Aufbau der Chromosomen nicht verständlich. Man findet zu Beginn der groben Granulierung, wenn zwischen den einzelnen Granula noch reichlich Material liegt, gar nicht selten fibrilläre Strukturen, die in längeren, oft spiralig aufgewickelten Zügen angeordnet sind und die Körnchen durchlaufen (Abb. 19). Eine Zuordnung der fibrillären Züge zu der Größe und Form der Körnchen ist aber nicht feststellbar. Die Schwierigkeit, die morphologischen Erscheinungen bei der Karyoplasmakondensation mit der

Struktur der Chromosomen zu vereinen, wird von vielen Untersuchern empfunden [Burgos u. Fawcett (1956), Yasuzumi (1956), Yasuzumi, Fujimura u. a. (1956), Fawcett (1958)]. Die mit längsorientiertem Chromatin ausgerüsteten Spermienkerne, teils fibrillärer, teils lamellärer Struktur geben ebenfalls keinen Hinweis auf ein allgemeines Ordnungsprinzip des kondensierten Chromatinmaterials [Gibbons u. Bradfield (1956), Dass u. Ris (1957), Rebhuhn (1957),

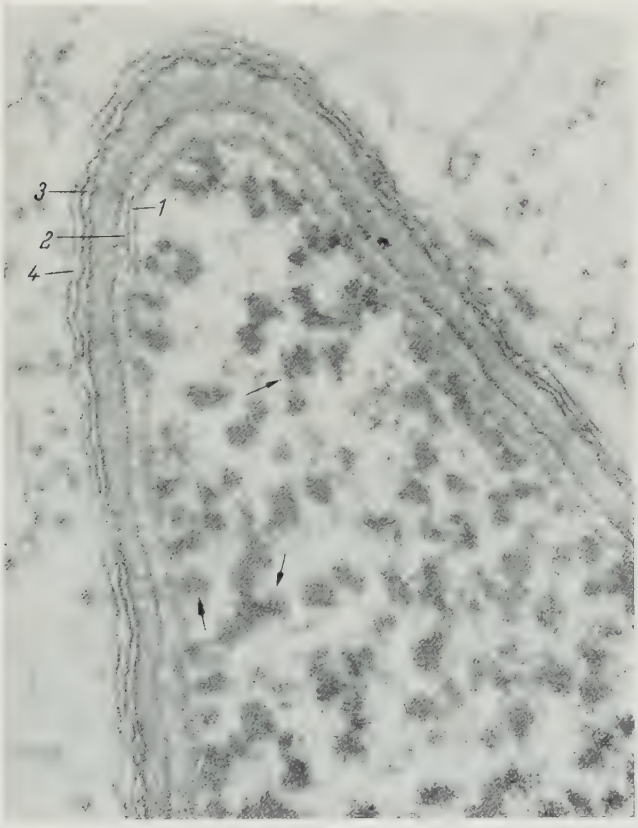


Abb. 19. Kopfspitze einer Spermatide (Phase 3). Grobe Körnelung des Karyoplasma mit viel Material zwischen den Körnern. *1* Kern-Cytoplasmaspalt, *2* inneres und *3* äußeres Blatt der cytoplasmatischen Umhüllung des Akrosoms, *4* Spalt zwischen Spermatide und Sertoli-Zelle, ↑↑ Züge paralleler Fibrillierung, die durch die Körner verlaufen. Vergr. 72000fach

Gall u. Bjork (1958), Yasazumi u. Tanaka (1958)]. Nach den bisherigen Untersuchungen wird das Chromatinmaterial in den Spermien verschiedener Tiere auf unterschiedliche Weise kondensiert, wodurch sehr verschiedene „Kondensationsstrukturen" entstehen, während das Bauprinzip der Chromosomen im aufgelockerten Zustand der Interphase überall das gleiche ist. Die Chromosomenstruktur hat auf die Kodensationsstruktur des Chromatins im reifen Spermatozoon entweder keinen oder nicht überall den gleichen Einfluß.

Die lebhafte Stoffabgabe des Kerns erfolgt, wie wir gesehen haben, in 2 ungleichen Schritten. Anfangs werden von der Kernoberfläche Lamellensysteme abgeblättert, die aus hellen und dunklen Lagen bestehen. Die dunklen Lagen enthalten das elektronendichte Material, das zuerst in den Kernporen erscheint.

Es hat den Anschein, daß es sich dabei um die gleiche Substanz handelt, die am Ergastoplasma als Ribosenukleinsäure (Palade-Körnchen) erkannt wurde. Wie wir aus den Untersuchungen von Brachet und anderen Autoren (Lit. bei Brachet 1957) wissen, enthält das reife Spermatozoon keine oder nur sehr wenig Ribosenukleinsäure. Damit stimmt überein, daß der Proteinstoffwechsel des reifen Spermium sehr gering ist, wenn er nicht überhaupt fehlt (Martin u. Brachet 1959).

Im elektronenmikroskopischen Bild verschwinden die kaudalwärts abgewanderten Lamellensysteme aus dem Cytoplasma bei fortschreitender Reifung der Spermien vollständig. Zwischen Entstehen und Vergehen dieser Struktur liegt die Differenzierung des Mittelstückes und Schwanzes, die sicher nicht ohne Proteinstoffwechsel möglich ist.

Die Verdichtung des Kernmaterials unter starker Flüssigkeitsabgabe in großen Vakuolen erfolgt als 2. Schritt der Stoffabgabe erst, wenn die cytoplasmatischen Strukturen schon weit differenziert sind. Lediglich die Mitochondrien haben dann noch nicht ihre endgültige Form und Lage. Während der Ausbildung der großen Vakuolen erscheint im Cytoplasma noch das streifenförmig angeordnete Material mäßiger Elektronendichte, das sich lichtmikroskopisch als eosinophil erweist. Vermutlich wird auch diese Substanz aus dem Kern abgegeben.

Zusammenfassung

1. Das *Akrosom* bildet sich aus der Akrosomvakuole, die nahe der Kernoberfläche im Zusammenhang mit dem Golgikomplex entsteht. Der Ort ihrer Entstehung entspricht nicht der späteren Lage des Akrosoms. Neben dem Golgikomplex erscheinen während der Akrosombildung stark osmiophile Körnchen. Nach der Ausbildung des Akrosoms legt sich das Cytoplasma der Sertoli-Zellen der vom Akrosom bedeckten Kopfspitze der Spermatide eng an, und es treten Anzeichen eines Stoffwechsels zwischen Spermatide und Sertoli-Zelle auf.

2. Das *Karyoplasma* der jungen Spermatide hat die gleiche Struktur wie das anderer Interphasenkerne. Die schon während der Chromatinkonzentration sichtbaren, 180—200 Å dicken Körnchen werden in der 1. Phase gleichmäßiger verteilt und dichter. In der 2. Phase erscheinen grobe Körnchen von 600—700 Å an der Kernmembran; im Bereich der Kernkappe, und im kaudalen Kernbereich treten größere Vakuolen auf. In der 3. Phase werden die Körnchen im ganzen Kern vergrößert. Die grobe Granulation ist erst locker und wird zunehmend dichter. Schließlich ist das gesamte körnige Material bis auf Reste der weniger dichten Kernsubstanz zusammengebacken. In dieser Phase treten besonders große Vakuolen im kaudalen Karyoplasma auf.

3. Während der Chromatinkondensation *treten Stoffe aus dem Kern* aus. Schon in der 1. Phase wird elektronendichtes Material aus Membranporen abgegeben, die in regelmäßigen Abständen nebeneinander liegen. Die aus dem Kern abgegebenen Substanzen werden in Lamellen vom Kern abgehoben, wodurch „Lamellenkörper" entstehen. Wenn die Kernvakuolen in der 3. Phase erscheinen, werden keine Lamellenkörper mehr gebildet. Die Flüssigkeitsvakuolen im Karyoplasma werden gegen Ende der Spermiohistogenese an das Cytoplasma abgegeben.

4. Das proximale *Centrosom* besitzt einen seitlichen Fortsatz, der schon von Meves (1899) beschrieben wurde.

Literatur

Ånberg, Å.: The ultrastructure of the human spermatozcon. Acta obstet. gynec. scand. **36**, Suppl. 2 (1957).

Bargmann, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Baud, C. A.: Ultrastructure et functions de la membrane nucleaire. In I. A. Thomas, Problémes d'ultrastructures et de fonctions nucleaires. Paris: Masson & Cie. 1959.

Brachet, J.: Biochemical Cytology. New York: Academic Press (1957).

Clermont, Y., and C. P. Leblond: Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the „Periodic acid-Schiff" technique. Amer. J. Anat. **96**, 229—254 (1955).

Colwin, A. L., L. H. Colwin and D. E. Philpott: Electron microscope studies of early stages of sperm penetration in Hydroides hexagonus (Annelida) and Saccoglossus Kowalewskii (Enteropneusta). J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 489—502 (1957).

Dass, C. M. S., and H. Ris: Submicroscopic organization of the nucleus during spermiogenesis in the grashopper. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 129—132 (1958).

Fawcett, D. W., and M. H. Burgos: Observation on the cytomorphosis of the germinal and interstitial cells of the human testis. In: Cr. E. W. Wolstenholme, and E. C. P. Millar, edit. Ciba Found. Collontgeing **2**, 86—99. London: J. A. Churchill 1956.

—, and K. R. Porter: A study of the fine structure of ciliated epithelia. J. Morph. **94**, 221—282 (1954).

Fawcett, D. W.: The structure of the mammalian spermatozoon. Int. Rev. Cytol. **7**, 195 bis 234 (1958).

Gall, J. G., and L. B. Bjork: The spermatid nucleus in two species of grasshoppers. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 479—484 (1958).

Gibbons, I. R., and J. R. G. Bradfield: The fixation of cell nuclei by osmium tetroxide. Biochim. biophys. Acta **22**, 506—513 (1956).

Horstmann, E., u. A. Knoop: Zur Struktur des Nucleolus und des Kernes. Z. Zellforsch. **46**, 100—107 (1957).

Martin, F., and J. Brachet: Autoradiographic studies on the incorporation of amino acids into spermatozoon. Exp. Cell Res. **17**, 399—404 (1959).

Meves, Fr.: Über Structur und Histogenese der Samenfäden des Meerschweinchens. Arch. mikr. Anat. **54**, 329—402 (1899).

Nebel, B. R., S. A. Tyler and C. J. Murphy: A note on the statistical determination of shape of chromatin elements in human spermatid and tradescantia microsporocyte. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 377—380 (1960).

Rebhun, L. I.: Nuclear changes during spermiogenesis in a pulmonate snail. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 509—524 (1957).

Schultz-Larsen, I.: The morphology of the human sperm. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 128 (1958).

Wada, S. K., I. R. Collier and J. C. Dan: Studies on the acrosome. V. An egg membrane lysin from the acrosomes of Mytilus edulis spermatozoa. Exp. Cell Res. **10**, 168—180 (1956).

Yasuzumi, G.: Electron microscopy of the developing spermhead in the sparrow testis. Exp. Cell Res. **11**, 240—243 (1956).

— W. Fuzimura, A. Tanaka, H. Ishida and T. Masuda: Submicrosopic structure of the sperm-head as revealed bei electron microscopy. Okajimas Folia anat. jap. **29**, 133—138 (1956).

—, and H. Tanaka: Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VI. Researches on the spermatozoon dimorphism in a pond snail Cipangopaludina malleata. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 621—633 (1958).

Prof. Dr. Dr. E. Horstmann,
Anatomisches Institut der Universität, Hamburg 20, Martinistr. 52

Zeitschrift für Zellforschung 54, 90—104 (1961)

From the Zoological Institute, University of Stockholm

THE SKIN OF AMPHIOXUS*

By

Ragnar Olsson

With 11 Figures in the Text

(Received December 21, 1960)

Introduction

The body covering of the lancelet, *Amphioxus lanceolatus*, attracts the interest of the histologist for several reasons. One of them is from a descriptive and comparative dermatological point of view because the skin of Amphioxus is unique in the chordate series in being provided with a single-layered epidermis only. The sub-epithelial layers are still insufficiently known in detail and their homologies upwards in the series are very vague, which has resulted in a very confusing terminology.

The mono-layered epidermis is, with the exception of the sensory elements, built up of one single type of epidermal cells only. A functional cytological aspect is the study of the detailed morphology of these cells for the purpose of trying to establish whether they are capable of performing the same tasks as those carried out by several types of specialized cells in the epidermis of the vertebrates.

All the authors seem to agree that the epidermal cells are covered by a thin structureless layer which is called "cuticle" by Wolff (1889), Joseph (1901), Studnička (1909), Pietschmann (1929) and Young (1950), "limitans" by Schneider (1902) and "'cuticular' layer" by Andrew (1959). Franz (1923, 1927) avoided the term cuticle and considered it to consist of a thin layer of mucus.

Below this apical layer a somewhat broader and striated cell portion is found, Stieda (1873), which has been called a broad, porous border by Rolph (1876), a thick porous cuticle by Langerhans (1876), a porous pseudocuticle by Pietschmann (1929) and a cuticular border by Krause (1923). Studnička (1897, 1909) called it "Deckplatte" and described it as a lamellated "exoplasm" protecting the soft "endoplasm" of the epidermal cells. Other authors (Wolff, Franz, Andrew) look upon this layer as the specialized apical region of the cells which appears striated because of longitudinal rods which, according to Rabl, contain secretory substances.

Several authors have described granules in the cytoplasm of these cells and in some cases distinct terminal bars have been reported. Joseph (1900) recognized a special basal cell region which Studnička called "Basalplatte" and considered to be a basal exoplasmic attachment region attaching the epidermal layer to corium. Franz (1927) described a tiny striation also in this cell region.

* Aided by grants 2124-4/5 from Statens naturvetenskapliga forskningsråd.

Material and Methods

Several adult lancelets, *Amphioxus (Branchiostoma) lanceolatus*, as well as some larvae were used for this study[1]. For the electron microscopical as well as the light microscopical investigations the body covering from different regions was used, as the tip of the snout, the "olfactory" pit, the metapleural folds, and the tail.

Light microscopy. The skin pieces were fixed in formol and the fixing fluids according to Bouin, Helly, Zenker and Maximow. The following techniques were applied on ordinary paraffin sections, 3—7 μ thick (cf. Romeis 1948, Pearse 1960): Azan, chrome alum haematoxylin, paraldehyde fuchsin, toluidine blue, Astra blau, mucicarmine, mucihaematein, periodic acid/Schiff, ninhydrin/Schiff, Sudan black B, pyronin/methyl green, and the nucleal test. A differential staining method for connective tissue fibres (Lubow and Dolnick 1951) was also used.

Electron microscopy. Small skin pieces were fixed in the usual Palade mixture with an osmic tetroxide content of 1—2% at varying molarities between 0.5 and 1.1, which were obtained with either sodium chloride or sucrose. The best fixing results were obtained in the fluid with the highest tonicity, which roughly corresponds to that of sea water. If, however, the tissue pieces were rinsed in distilled water or ordinary tap water after fixation they were completely ruined as the result of a pronounced swelling. In order to avoid this inconvenience the tissues were rinsed in the fixing fluid without the addition of osmic tetroxide. After about half an hour an equal amount of absolute alcohol was gradually added to the rinsing fluid during thorough stirring to make a 50% alcohol solution of lower tonicity. Eventually the same procedure was repeated and the result was a 75% alcohol solution. The pieces were afterwards transferred to 90% and stronger solutions according to the usual scheme and polymerized in metyl-/butylmetacrylate (1:4). Some pieces were embedded in Vestopal W after acetone dehydration. Observations and micrographs were made with the Akashi TRS-50 electron microscope. Magnification notes within brackets in the legends indicate the electron optic magnifications, the others the final printing magnifications. Micron marks accompany the micrographs except Fig. 8.

Results

1. Histochemical reactions

The "cuticle" layer. The thin surface layer, which is often referred to as the cuticle, is intensely stained with the paraldehyde fuchsin (Fig. 1) and chrome haematoxylin techniques. Furthermore it gives a strong reaction with Astra blau after oxidization, with periodic acid/Schiff after diastase digestion, mucihaematein, and mucicarmine. It is pyroninophile as well but because this reaction is not abolished after ribonuclease treatment it seems to be a false nucleoprotein reaction. Some droplets which adhere to the cuticle are strongly metachromatic but this reaction is not given by the cuticle itself.

The striated zone ("Deckplatte") consists of the prominent rods or streaks described by earlier authors. They stain intensely with paraldehyde fuchsin (Fig. 1) and chrome haematoxylin but give no reactions with the other techniques used here. With the exception of the longitudinal streaks, this zone gives a stronger sudanophilia than the other cell regions.

The supranuclear zone. Most cells contain a homogeneous juxtanuclear material which gives a diastase digestible periodic acid/Schiff reaction. It is also reactive with paraldehyde fuchsin, chrome haematoxylin, Astra blau after oxidization, mucihaematein and mucicarmine. Methyl green/pyronine gives a strong reaction but not after previous ribonuclease treatment.

[1] I have much pleasure in thanking Dr. Bertil Swedmark, Director of Kristinebergs Zoologiska Station, who kindly provided me with working facilities at the station and supplied me with the material.

Some cells contain granules or droplets in the apical cytoplasm. This material usually gives a diastase-fast periodic acid/Schiff reaction.

The nucleus gives a moderate reaction for ribonucleic acids (pyronine) but only a weak reaction for desoxyribonucleic acids as demonstrated by the nucleal test.

The basal cell zone is prominent as a narrow streak in the periodic acid/Schiff preparations. The thin plasma layer close to the basal cell membrane which is here stained deeply red seems to correspond to the "Basalplatte" or "Zellsockel"

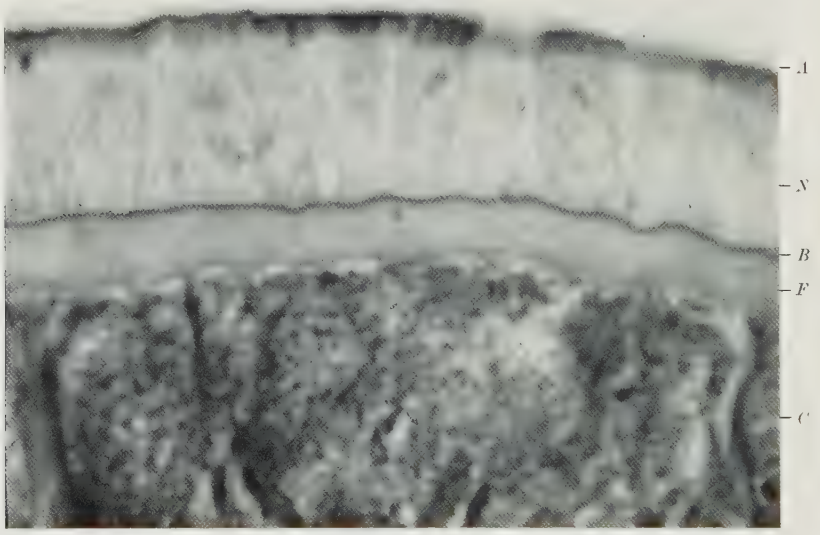


Fig. 1. The skin of Amphioxus in a 5 μ paraldehyde fuchsin preparation without nuclear stain, 2100 ×. *A* apical zone of epidermal cells with "cuticle" and striation; *N* nuclear zone; *B* basement membrane; *F* fibre layer; *C* loose connective tissue with fibre bundles

of earlier authors. This reaction is completely abolished after previous digestion with deastase.

The histochemical reactions of the epidermal cells are summarized in Fig. 2.

A basement membrane is clearly seen in the paraldehyde fuchsin preparations (Fig. 1). Apparently it gives a faint reaction with periodic acid/Schiff as well as with Astra blau after permanganate oxidation.

The fibre layer immediately below the epidermis stains intensely blue with LUBOW and DOLNICK'S differential staining method for keratin and connective tissue fibres.

The connective tissue ground substance gives, as is well known from earlier investigations, strong reactions for mucus. The bundles which originate at the fibre layer and penetrate the connective tissue react in the same manner as the fibre layer.

2. Fine structure

a) Epidermis. *The free cell surface* of the epidermal cells carries an abundance of short but relatively broad microvilli when seen in the electron microscope, the average length of which is 260–330 mμ and the width at the

broadest place 90—140 mμ (Figs. 3, 4). The proximal portion of the microvilli is somewhat thinner and forms a distinct neck region. A sharply defined central core of comparatively dense protoplasm is seen inside the microvilli and this dense material may extend for a short distance in the apical cytoplasm below the terminations of the microvilli.

The superficial cell region also contains several large and prominent vesicles which are identical with the "rods" causing the striated border which is seen in the light microscope (Fig. 4). They enclose a granular material and, in some cases, an accumulation of dense material, which gives the whole structure the appearance of a small nucleus with its nucleolus. The vesicles have an ellipsoid form with the longitudinal axis paralleling the longitudinal axis of the cell. Their maximum length is more than 1 micron but they are usually somewhat shorter in the sections. The vesicle apex may be in contact with the surface membrane of the cell and it is also often seen to form a microvilli-free protrusion of the surface (Fig. 4). Sometimes a vesicle is found in an opened condition like that shown in Fig. 5. At least in some cases it seems obvious that they demonstrate a real phase in the vesicle life cycle rather than being the result of an artificial collapse caused during preparation.

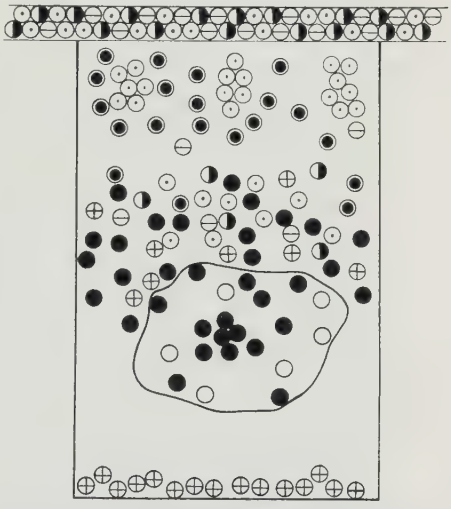


Fig. 2. Diagrammatic representation of the distribution of certain substances in an epidermal cell ⊕ Glycogen; ⊖ Mucins; ◑ -SS- -SH; ● RNA; ○ DNA; ◉ Lipides; ○ Paraldehyde fuchsin pos.

The surface of the epidermal cells is coated with an indistinct layer of a finely granulated material. It is found between the microvilli but also reaches some distance above the tips of these structures (Fig. 4). This material has a very irregular appearance which varies from preparation to preparation. In the most typical form it consists of a homogeneous material containing an abundance of more or less dense granules. The material has no well-defined outer surface but exhibits a number of irregular extensions. It is obvious that the fixation was not very successful on this material.

Some cells at the bottom of the "olfactory" pit carry a few but tall cilia. This is the only place on the body where cilia-carrying epidermal cells have been seen.

The adjoining cell surfaces are conspicuously corrugated and each process of one cell fits closely into a groove in its neighbour. Membrane specialization in the form of desmosomes or terminal bars were never found. The cytoplasm close to the cell membrane appears somewhat more compact than that of the rest of the cell and it shows, in some places, an inconspicuous fibrillation which suggests bundles of tonofilaments (Fig. 4). At high magnifications a dense feltwork of fibrils with a mean diameter of 9 mμ is often revealed along the cell membranes (Fig. 6). Sometimes tiny homogeneous cell inclusions are found among the fibrils.

A feature which in every section is as prominent as it is perplexing is the distinct dark spot which is usually seen in the interlocking tongues, which are formed by the membrane corrugations (Fig. 4). Obliquely cut tongues show it as a rodlike structure (Fig. 6).

Fig. 3. Epidermal cell. *A* apical row of large vesicles; *N* nucleus; *B* basal row of vesicles. 17 000 × (4000 ×)

The basal surface of the epidermis is formed by the straight basal cell membranes which rest upon the dermis. Also in this region a comparative dense cytoplasm layer which contains bundles of tiny filaments is found along the membrane. Most of the space close to the membrane is however occupied by closely packed and somewhat elongated vesicles (Fig. 3).

They are apparently lined by a single lamella which has no connection with the cell membrane. Most of these vesicles contain an undefined material of low density.

The central portion of the epidermal cells appears much less compact than the surface layers because it is strikingly vesiculated. It seems as if at least a

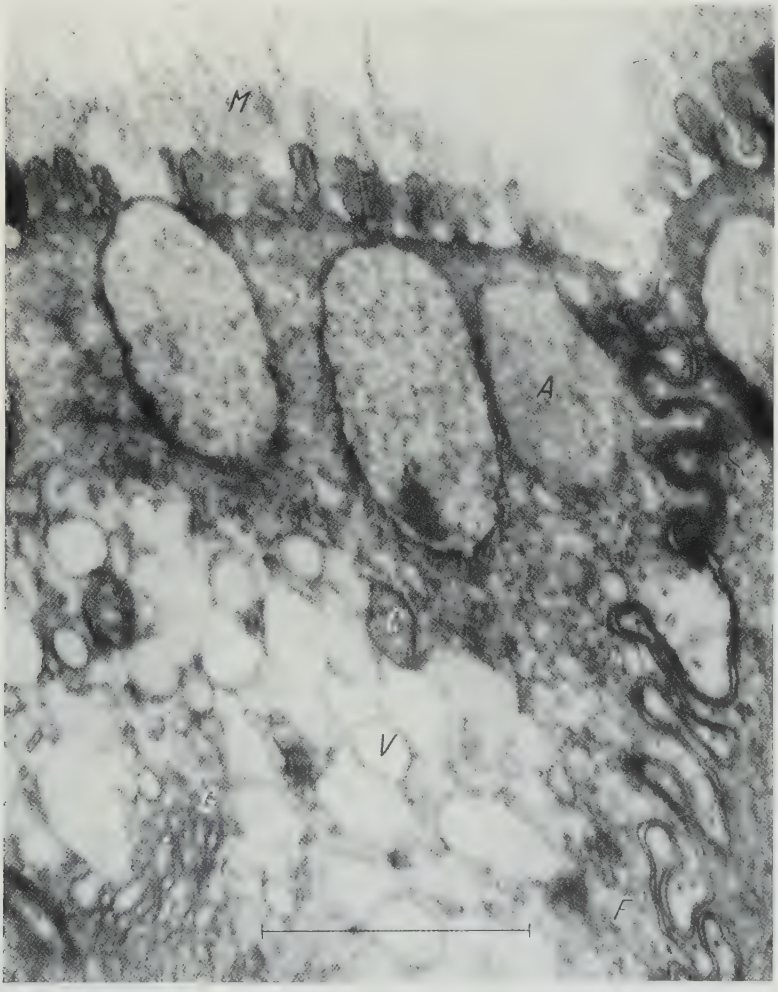


Fig. 4. The apical region of an epidermal cell. *M* fragmentarily preserved mucus layer among the microvilli. *A* apical vesicle; *C* mitochondrion; *F* fibrillation; *G* Golgi complex; *V* vesiculated central portion of cytoplasm. 35000 × (10000 ×)

great number of these vesicles are members of the prominent Golgi complex, which is usually cut as a curved bundle of lamellae with the ends dilated to vesicles (Fig. 7). The lamellated part of the complex is usually situated close to the apical part of the nucleus.

If a pigmented skin area has been cut some cytoplasmic vesicles may be found which contain irregular pigment bodies each of which is composed of closely packed granules with a diameter of approximately 15 mμ. This is espe-

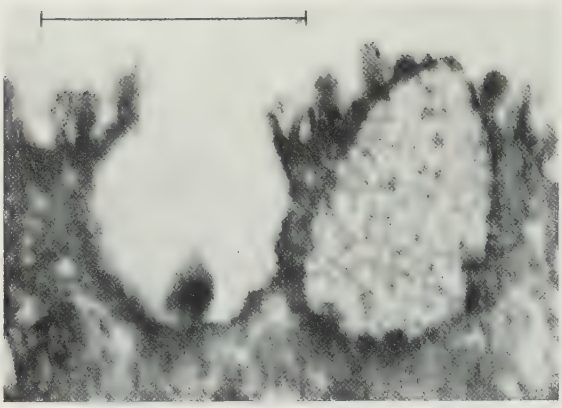


Fig. 5. An apical vesicle which has emptied its finely granulated material. 35000 × (10000 ×)

cially the case in the basal part of the cell. A close relationship between several of the pigment vesicles and mitochondria suggests a connection between these two structures.

The cells contain rather few mitochondria which are uniformly distributed in the cytoplasm. The nucleus is slightly oval with the longitudinal axis oriented perpendicularly to the cell axis. It has a very irregular surface with deep membrane infoldings. It was never possible in an epidermal cell to find an ergastoplasm composed of the two characteristic components, the ergastoplasmic membranes and the ribonucleoprotein granules.

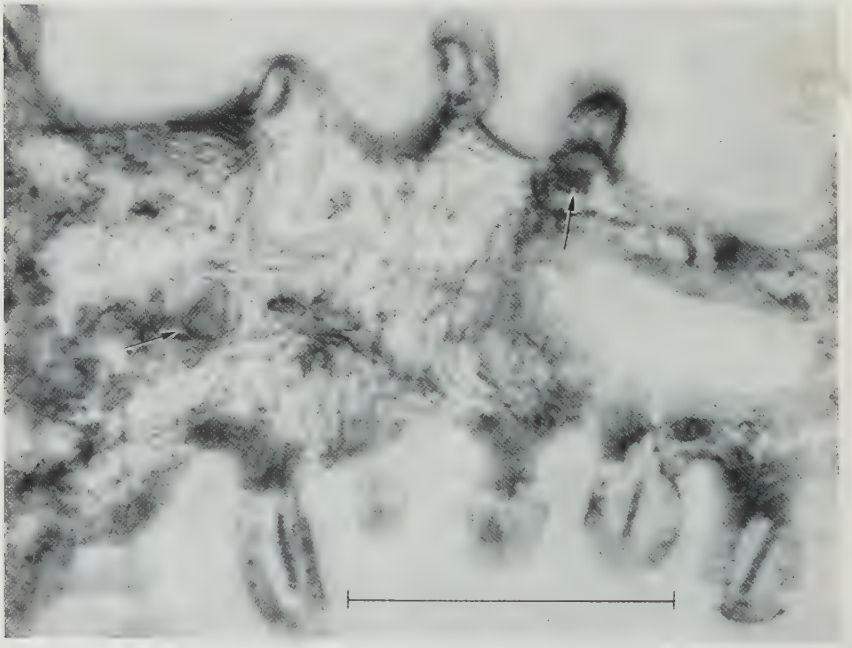


Fig. 6. The wall part of an isolated epidermal cell. Note tonofilaments and granules (arrows) as well as the rodlike structure in the tongues. 42000 × (12000 ×)

b) Fibre lamella. "*Basement membrane*". The epidermal cells rest upon a membrane which is about 110 mμ thick. The distal half of this membrane, or usually less than that, forms an electron dense layer with an irregular surface bordering the epidermal cells (Fig. 8). The basal and less dense layer of the membrane frequently gives off tiny processes into the underlying fibre layer. In some cases these processes bend at right angles in the fibre layer and give

the impression of being branches of collagen fibres (Fig. 8, arrow). In other cases they seem to penetrate the fibre layer in a straight course and join the perpendicular fibre bundles which traverse the underlying loose connective tissue.

The fibre layer proper is composed of several lamellae of fibrils. The number of lamellae varies in different body regions but a mean value seems to be 16—40. Also the thickness of these cylindrical fibres differs considerably but they are usually about 75 mμ in diameter. A lamella may contain

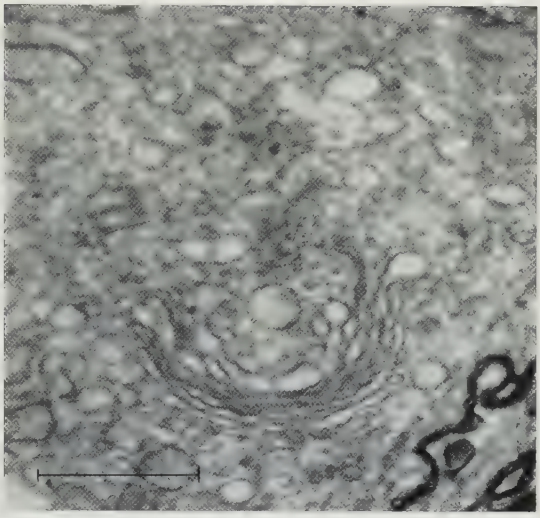


Fig. 7. Golgi lamellae and the typical vesiculated central cytoplasm. 21000 × (6000 ×)

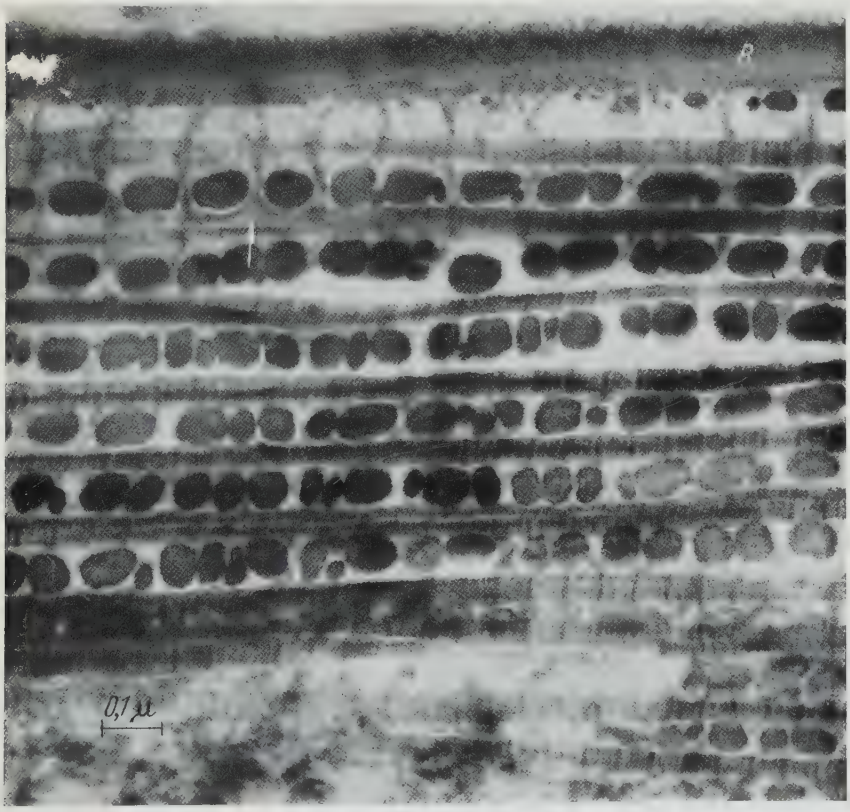


Fig. 8. Subepithelial zone after the epidermal cells have been removed. The double-layered basement membrane (*B*) sends processes into the fibre layer (arrow). Note the regular change of fibre orientation and the internal fibre periodicity. 78000 × (15000 ×)

a single layer of fibres or in some cases a few layers of them. Any successive lamella shows a change in fibre orientation by approximately 90° which gives the whole fibre layer a very characteristic appearance in the micrographs (Figs. 8, 10). These fibres have the characteristics of collagen and show a periodicity which is measured to 61 mμ. Each period contains one broad and four narrower electron dense bands.

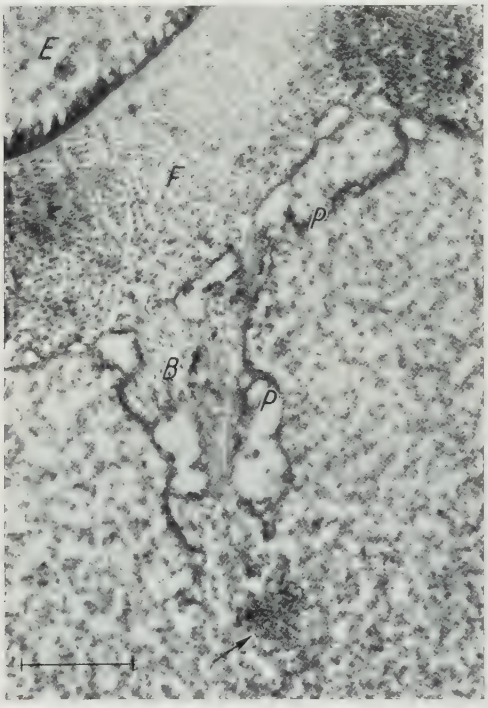


Fig. 9. Fibre layer (*F*) at the point where a perpendicular fibre bundle (*B*) is given off. Fibrocyte processes (*P*) follow the bundle for a short distance into the loose connective tissue but when cut below this point the bundle appears naked (arrow). *E* epidermal cell. 14800 × (4500 ×)

The fibrocyte layer. In some body regions, as the tip of the rostrum, the deepest fibre lamella directly borders the connective tissue (Figs. 8, 10). In other places the two layers are separated by a system of membranes (Fig. 9), which apparently belong to the flattened processes of fibrocytes.

c) Connective tissue. The dominating component of the connective tissue below the fibre lamella is the finely granulated ground substance (Fig. 9). In this substance lacunae and nerve fibres may be found but other cellular components were never seen in the micrographs.

The ground substance is penetrated by the perpendicular fibre bundles which originate in the fibre lamella (Fig. 1). As has been suggested above some of the fibres in these bundles may be derived from the basement lamella but the majority of them are apparently branches from members of the fibre lamella (Fig. 10). The diameter of these fibres is usually only 20—40 mμ but they still show the same periodicity as the thicker fibres of the lamella.

In body regions where the fibre layer rests upon fibrocytes the membranes of these cells follow the perpendicular fibre bundles for a short distance below the fibre lamella in the form of tubes (Fig. 9). As a result of this condition bundles which have been cut in the vicinity of the fibre layer appear sheathed in the micrographs, while those which are found deeper in the connective tissue are naked.

d) The skin of a 3,5 mm larva. The epidermal cells at this stage suggest those of the adult but they form a squamous epithelium. They carry neither cilia nor surface projections in the form of microvilli, but they are provided with the same vesicular surface organellae as the adult cells. The vesicles contain

a granulated substance, which seems eventually to be released from the vesicle apex at the epidermal surface. The basal cell region contains a layer of closely packed small vesicles just as is the case in the cells of the adult animal. The fibre layer below the epidermis has the same general structure as in adult animals but it contains fewer layers, generally about 4—5 layers in each direction.

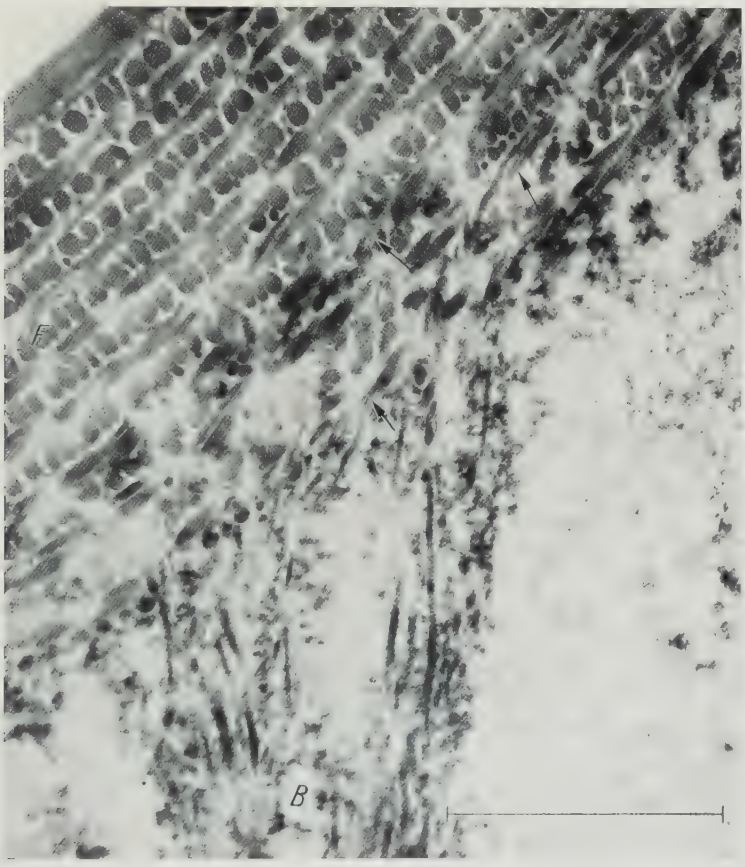


Fig. 10. A perpendicular fibre bundle (*B*) leaves the fibre layer (*F*). The bundle fibres appear to originate as branches from the thicker fibres (arrows). 36500 × (15000 ×)

Discussion

1. The function of epidermis

Protective properties. A very important purpose of any epidermis is of course surface protection. Among the invertebrates this protection is often achieved by the presence of a non-cellular cuticle of chitin or proteins. The higher vertebrates obtain the same effect with the aid of an outer layer of keratinized epidermal cells.

Amphioxus apparently belongs to neither of these groups, but at the same time there are reasons which speak in favour of both of them. The epidermal cells are covered by a very thin non-cellular layer and the histochemical investigations indicate that this layer contains mucoid substances together with proteins.

The electron micrographs confirm that it may consist of a thin mucoprotein layer which has been only fragmentarily preserved by the osmic tetroxide fixation. This opinion is quite in accordance with FRANZ (1923, 1927), who avoided the term "cuticle", but called it a mucus layer.

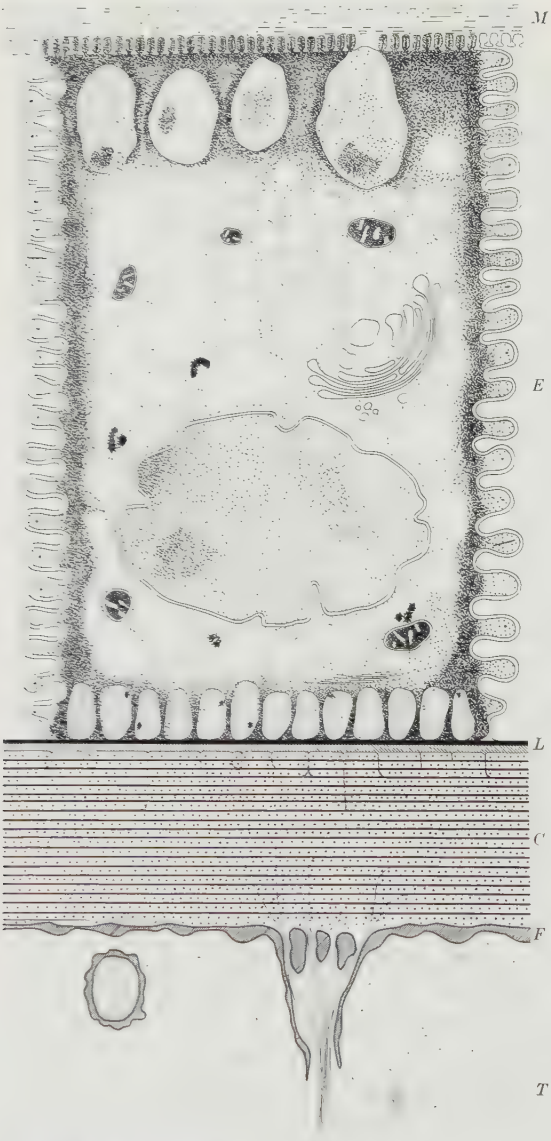


Fig. 11. Diagrammatic representation of the skin of Amphioxus at a magnification of about 12 000 ×. *M* mucus surface layer; *E* epidermis; *L* lamina terminalis; *C* corium fibre lamella; *F* fibrocyte layer; *T* loose connective tissue

It may seem astonishing that the epidermal cells are richly provided with microvilli, which are generally considered to be attributes of intensely absorbing cells. Microvilli have, however, in some instances been described from cells which definitely do not have, or at least do not exclusively have, absorptive properties, as parietal cells, mucus cells of gastric mucosa, and cells from several ciliated epithelia (see FAWCETT 1958). It is probable that they, in this case, constitute another means of obtaining surface protection, for they must be very effective in attaching and strengthening the mucus layer.

It has not been possible to demonstrate terminal bars or desmosomes in the epidermal cell walls of *Amphioxus* although these specializations are typical for the epidermal cells of higher vertebrates (granules of Ranvier, nodes of Bizzozero). The mechanical resistance against forces which might separate the cells is in this case obtained with the aid of the pronounced interdigitation of the corrugated cell walls.

It seems as if the cells also obtain a certain degree of rigidity in the typical "vertebrate" manner, that is by synthesizing special hardened products which are retained in the cytoplasm. PORTER (1954) described in the epidermal cells of *Amblystoma* an abundance of tiny tonofilaments with a diameter of 6—10 mμ. WEISS and FERRIS (1954) found the same structure in other amphibians and

measured the mean diameter of the filaments to 20 mμ. They were concentrated close to the cell membrane and apparently originating from some dense bodies which were situated just below the membrane. It is probable that the fibrous cytoplasmic material which is found in the epidermal cells of the lancelet is the counterpart of these tonofilaments in the epidermal cells of lower vertebrates. Their mean diameter is in this case approximately 9 mμ and although they are not abundant enough to yield histochemical reactions it seems reasonable to surmise that they represent a keratinous component of these cells. The homogeneous bodies which are sometimes seen among the tonofilaments are very like the keratohyalin granules described by Brody (1959) from the stratum granulosum of mammals, but it is of course possible only to hazard a guess about their significance.

Weiss and Ferris (1954, 1956) and Weiss (1958) described "adhesive discs" at the basal wall of the amphibian epidermal cells. These structures were considered to be a mechanism of attachment, cementing the epidermis to the underlying basement membrane. Such "bobbins" are not found in *Amphioxus* but it is possible that the basal layer of vesicles, which is apparently rich in glycogen, in some way carries out a cementing action.

Secretory properties. According to these interpretations the synthesizing capacity of the epidermal cells is at least twofold: The production of a mucous substance which is eventually released apically as the protective mucus layer and the production of a keratinous substance for internal cellular utilization.

The apical cell cytoplasm is rich in mucous material which probably has some connexion with the very elaborate Golgi complex. The significance of the large apical vesicles which are situated close to the surface is obscure because they apparently do not contain mucous products. Anyhow it is very likely that they contribute to the formation of the mucus layer by emptying their content among the microvilli. The final product is a mucous substance containing SH- or SS-groups. It is interesting to note that epidermal cells of higher vertebrates have the ability to produce the same substances (Wislocki, Fawcett and Dempsey 1951, Patzelt 1954), which in this case are believed to act as cementing substances.

Although the apical cytoplasm is rich in nucleic acids it has not been possible to demonstrate ergastoplasmic membranes here or in other parts of the cytoplasm. It must then, in the absence of acid mucopolysaccharides, be believed that the cytoplasmic basophilia is caused by an unorganized ergastoplasm of free ribonucleoprotein granules. This simple kind of ergastoplasm is known from, among others, such cells as produce proteins which are retained in the cytoplasm for the purpose of the cell itself, e.g. epidermal and muscle cells of mammals. This fact may be a further indication of a keratin synthesis in these cells. Glycogen has been assumed to be a raw material for keratinization (Wislocki, Fawcett and Dempsey 1951) and this substance is also abundant in the epidermal cells of the lancelet.

Storing properties. The basal row of vesicles in the epidermal cells gives an intense reaction for glycogen. It is of course possible that this fairly large amount of glycogen serves as an energy depot and a store of raw material for cellular synthesis.

Pigment formation. The epidermal cells in some body regions contain pigment granules (FRANZ 1927). In the absence of any kind of chromatophores the single epidermal cell type of *Amphioxus* must have the ability to produce pigment as well. The granules are enclosed within a membrane and they are not homogeneous but finely granulated like the pigment granules in human skin described by PEASE (1951). Several cell organella are probably involved in the pigment formation (HORSTMANN 1957) and in this case a striking relationship between mitochondria and pigment vesicles was often observed (cf. WOODS et al. 1949).

Excretory properties. VAN WEEL (1937) found that melanine as well as carbon particles which had been taken up by the digestive system were delivered to the epidermal cells between the metapleural folds. The author suggested that the particles were eventually released from the body by way of the epidermal cells. Cells from the same body region were used in the present investigation but it has not been possible to demonstrate any cytological evidence of such a cell excretion.

The same belly epidermal cells between the metapleural folds have also been shown to have the capacity of a weak uptake of radioactive iodine (THOMAS 1956). These cells as well as others have also been suggested as taking an active part in the respiration by allowing a passage between the body lacunae and the environment (see YOUNG 1950). It was not possible during this investigation to add any new information to these interpretations.

2. The sub-epithelial tissues

Most of the early authors as well as GOLDSCHMIDT (1908) and FRANZ (1927) called the whole fibre layer a basement membrane. STUDNIČKA (1909) denied the existence of such a membrane, while KRAUSE (1923) and RABL (1931) described it as an extremely thin layer below the epidermal cells. Entirely in accordance with these latter authors a thin "basement membrane" or *lamina terminalis* is always found between the epidermal cells and the corium fibre lamella. This lamina consists of two layers. The outer, finely granulated and electron dense, zone apparently serves as a foothold for the epidermal cells. The inner, electron translucent, region sends processes into the fibre lamella and thus seems to anchor the lamina basally.

The peculiar arrangement of collagen fibres oriented in two directions in alternating plies has been investigated in amphibians and some higher vertebrates with the aid of phase and electron microscopy by several authors (lit. in KEMP 1959). The only fact that will be noted here is that, in this case, the collagen fibres may apparently branch (cf. RINALDINI 1958) and the finer fibrils penetrate the underlying loose connective tissue in the form of the well-known collagen fibre bundles. It is possible that the fibre layer, which by different authors has been called by turns basement membrane, basement lamella, cutis or apical part of corium, represents the equivalent of the *stratum compactum corii* of lower and *str. reticulare* of higher craniotes. In most body regions this fibre layer rests upon the flattened and widely extended processes of fibrocytes, which are probably also the producers of the collagen fibres. The nuclei of these cells, which form the "upper cell net" according to GOLDSCHMIDT (1908), are rarely seen in the light microscope preparations between the fibre layer and the loose connective tissue.

The very loose connective tissue which underlies the fibre layer has in some cases been called "subcutis", but there are no facts which permit us to homologize it with the subdermal subcutaneous tissue of vertebrates. Its dominating component is the mucous ground substance and it chiefly suggests, if anything, the mucous connective tissue of the umbilical cord. It is probable that the two types of tissues have at least one important function in common, that of combining a high degree of tenacity and elasticity.

Summary

The skin of the lancelet, *Amphioxus lanceolatus*, was investigated with the aid of the electron microscope and some histochemical techniques. It was shown that the single type of epidermal cells is capable of performing several activities. These cells produce and attach a thin mucous surface layer and it is also suggested that a primitive form of keratinization occurs in them. Furthermore they may produce pigment granules and serve as glycogen stores. A thin lamina below the epidermal cells cements their basal surfaces and is itself basally anchored in the underlying corium with the aid of an elaborate system of processes. The corium fibre layer in most cases rests upon a single fibrocyte layer. It is at irregular intervals penetrated by bundles of fibres which originate as branches of the corium collagen fibres.

References

Andrew, W.: Textbook of Comparative Histology. New York: Oxford Univ. Press 1959.

Brody, I.: The keratinization of epidermal cells of normal guinea pig skin as revealed by electron microscopy. J. ultrastruct. Res. **2**, 482—511 (1959).

Fawcett, D. C.: Structural specializations of the cell surface. In: Frontiers in Cytology (Ed.: L. Palay), p. 19—41. New Haven 1958.

Franz, V.: Haut, Sinnesorgane und Nervensystem der Akranier. Jena. Z. Naturw. **59** 402—525 (1923).

— Morphologie der Akranier. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **27**, 464—692 (1927).

Goldschmidt, R.: Das Bindegewebe des Amphioxus. S.-B. Ges. Morph. Physiol. **24**, 53—78 (1908).

Horstmann, E.: Die Haut. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen (Ed.: W. Bargmann), Erg.-Bd. III/1, S. 1—276. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

Joseph, H.: Beiträge zur Histologie des Amphioxus. Arb. zool. Inst. Wien **12**, 99—132 (1900).

— Einige anatomische und histologische Notizen über Amphioxus. Arb. zool. Inst. Wien **13**, 125—154 (1901).

Kemp, N. E.: Development of the basement lamella of larval anuran skin. Developmental Biol. **1**, 459—476 (1959).

Krause, R.: Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere in Einzeldarstellungen, Bd. 4. Berlin: W. de Gruyter & Co. 1923.

Langerhans, P.: Zur Anatomie des Amphioxus lanceolatus. Arch. mikr. Anat. **12**, 290—342 (1876).

Lubow, A. M., and E. H. Dolnick: A differential staining method for elastic fibers, collagenic fibers, and keratin. Stain Technol. **26**, 119—121 (1951).

Patzelt, V.: Über Tonofibrillen, Keratohyalin, Glykogen und Verhornung in der Epidermis. Acta anat. (Basel) **21**, 349—356 (1954).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. London 1960.

Pease, D. C.: Electron microscopy of human skin. Amer. J. Anat. **89**, 469—497 (1951).

Pietschmann, V.: Acrania. In: Handbuch der Zoologie (Ed.: W. Kükenthal), Bd. 6/1. Berlin 1929.

PORTER, K. R.: Observations on the submicroscopic structure of animal epidermis. Anat. Rec. **118**, 433 (1954).
— Observations on the fine structure of animal epidermis. In: Proc. 3rd Intern. Conf. Electron Microsc., p. 539—546, London 1954.
RABL, H.: Integument. In: Handbuch der vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere (Ed.: Bolk-Göppert-Kallius-Lubosch), Bd. 1, S. 271—374. Berlin 1931.
RINALDINI, L. M.: The isolation of living cells from animal tissues. Int. Rev. Cytol. **7**, 587—647 (1958).
ROLPH, W.: Untersuchungen über den Bau des Amphioxus lanceolatus. Morph. Jb. **2**, 86—164 (1876).
ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948.
SCHNEIDER, K. C.: Lehrbuch der vergleichenden Histologie der Tiere. Jena 1902.
STIEDA, L.: Studien über den Amphioxus lanceolatus. Mém. Acad. St. Pétersbourg **19**, 1—71 (1873).
STUDNIČKA, F. K.: Über die Struktur der sog. Cuticula und die Bildung derselben aus den interzellularen Verbindungen in der Epidermis. S.-B. Böhm. Ges. Wiss. Prag 1897, S. 1—11.
— Vergleichende Untersuchungen über die Epidermis der Wirbeltiere. Anat. H. **39**, 1—267 (1909).
THOMAS, I. M.: The accumulation of radioactive iodine by Amphioxus. J. Marine Biol. Ass. U. K. **35**, 203—210 (1956).
WEEL, P. B. VAN: Die Ernährungsbiologie von Amphioxus lanceolatus. Pubbl. staz. zool. Napoli **16**, 221—272 (1937).
WEISS, P.: Cell contact. Int. Rev. Cytol. **7**, 391—423 (1958).
—, and W. FERRIS: Electron-microscopic study of the texture of the basement membrane of larval amphibian skin. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 528—540 (1954).
— — The basement lamella of amphibian skin. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 275—282 (1956).
WISLOCKI, G. B., D. W. FAWCETT and E. W. DEMPSEY: Staining of stratified squamous epithelium of mucous membranes and skin of man and monkey by the periodic acid-Schiff method. Anat. Rec. **110**, 359—376 (1951).
WOLFF, G.: Die Cuticula der Wirbeltierepidermis. Jena. Z. Med. Naturw. **23**, 367—384 (1889).
WOODS, M. W., H. G. DU BUY, D. BURK and M. L. HESSELBACH: Cytological studies on the nature of the cytoplasmic particulates in the Cloudman S 91 mouse melanome. J. nat. Cancer Inst. **9**, 311—323 (1949).
YOUNG, J. Z.: The Life of Vertebrates. Oxford 1950.

Docent RAGNAR OLSSON, Zoologiska Institutionen,
Stockholm Va, Rådmansgatan 70 A, Sweden

Zeitschrift für Zellforschung 54, 105—117 (1961)

Aus dem Histologischen Institut der Universität des Saarlandes, Homburg-Saar
(Direktor: Prof. Dr. H. Ferner)

DIE BILDUNG DER KOPFKAPPE (AKROSOM) BEI DER SPERMIENENTWICKLUNG DES MAUSWIESELS (*MUSTELA NIVALIS* L.)

Von

H. Ferner und I. Müller

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Dezember 1960)

1. Einleitung

Die morphologischen Veränderungen, welche die Spermatiden und ihre Zellorganellen (Mitochondrien, Zentriolen, chromatoide Nebenkörper, Akrosom) im Zuge der Spermiogenese und Spermiohistogenese erfahren, sind dank den Untersuchungen von Flemming (1880), Meves (1897, 1898), Branca (1924), Gatenby und Beams (1935), Fawcett und Burgos (1956) und anderer wohlbekannt.

Ein ebenso charakteristischer wie wichtiger Bestandteil des Spermienkopfes von Mensch, Säugern und Wirbeltieren überhaupt ist die sog. *Kopfkappe* (Akrosom), deren vorderer konvexer, mehr oder weniger zugeschärfter Randteil Perforatorium genannt wird. Während Stieve (1930) die Existenz einer Kopfkappe für das menschliche Spermium in Abrede stellte, haben die elektronen-mikroskopischen Untersuchungen von Fawcett und Burgos (1956), Ånberg (1957) u.a. das Vorhandensein erneut bestätigt. Nach Bargmann (1959) ist die Kopfkappe mit ihren Enzymen für die Haftung der Samenzelle am Ei und für das Eindringen in die Zona pellucida und in das Eiplasma von großer Bedeutung. Das Akrosom wird vom Golgi-Apparat hergeleitet. Für diesen mit allen charakteristischen Merkmalen ausgestatteten Golgi-Komplex der frühen Spermatiden sind in der älteren Literatur die Synonyma „Sphäre", „Akroblast", „Archoplasma" und „Idiozom" in Gebrauch, was teilweise zu Verwirrung geführt hat. Das Cytoplasma der frühen Spermatiden enthält außerdem granuläre Mitochondrien, einen oder mehrere basophile chromatoide Nebenkörper und die Zentriolen (Schaffer 1935, Gatenby und Beams 1935, Maximow 1939 u.a.). Daß die Vorläufer des Spermatiden-Akrosoms wahrscheinlich die intraarchoplasmatischen Granula in den Spermatocyten sind, haben schon Gatenby und Beams (1935) erkannt. In den frühen Spermatiden fanden sie einen kleinen Tropfen innerhalb einer Vakuole, welche sich an den Kern anlagert. Hierauf löst sich der angelagerte Golgi-Apparat von der Oberfläche der Vakuole los, die zusammen mit ihrem Inhalt zum Akrosom wird. Eine genaue Beschreibung bestimmter Phasen der Kopfkappenbildung bei menschlichen Spermatiden gaben Fawcett und Burgos (1956) auf Grund elektronenmikroskopischer Beobachtungen: In den frühen Stadien der Spermatiden läßt sich elektronenmikroskopisch der Idiozom-Golgi-Komplex als eine Ansammlung kleiner Vakuolen und Vesikel, sowie lamellärer Strukturen analysieren. Im Zuge der Reifung und Differenzierung der Spermatiden werden innerhalb besonderer Vakuolen des Golgi-Komplexes ein oder zwei große homogene

Granula von mäßiger Dichte gebildet, die Proakrosom-Granula. Durch Zusammenfließen der Vakuolen und der in ihnen enthaltenen Granula kommt es zur Bildung eines ziemlich großen Akrosom-Bläschens, welches ein einziges großes Akrosom-Granulum enthält. Das Bläschen hat wahrscheinlich einen flüssigen Inhalt und ist durch eine distinkte Membran begrenzt. Es legt sich dem vorderen Pol des Kernes an, wobei das Akrosom-Granulum an dem Teil der Wand des Bläschens fixiert wird, welcher der Kernmembran anliegt. Der Golgi-Apparat bleibt dem akrosomalen Bläschen zunächst eng angeschlossen und läßt weiterhin Vakuolen entstehen, welche vermutlich mit dem Bläschen verschmelzen, wodurch dieses sich vergrößert. Das akrosomale Granulum nimmt ebenfalls an Größe zu. Es ist zunächst rundlich, später flacht es sich ab und liegt häufig in einer flachen Eindellung des Kernes. Wenn sich die Kontaktfläche zwischen dem akrosomalen Bläschen und der Kernmembran durch die Ausbreitung des ersteren vergrößert, wird sein Lumen auf einen schmalen Spalt reduziert, so daß die Bildung gleich einem zweischichtigen Strumpf den vorderen Teil des Kopfes überzieht. Eine Schicht von dichtem körnigem Material ist an der Innenseite der Kernmembran abgelagert. Während dieser Entwicklung hat sich die Spermatide in die Länge entwickelt, der Golgi-Komplex hat sich vom Akrosom-Bläschen gelöst und ist an den hinteren Pol des Kernes gewandert. Die Plasmamembran am vorderen Ende der Zelle kommt in Kontakt mit der äußeren Membran des akrosomalen Bläschens. Die Substanz des Granulums, welches ursprünglich auf den vorderen Kernpol beschränkt war, breitet sich nunmehr lateralwärts aus und füllt den engen Spalt zwischen den beiden Schichten der Kopfkappe. Auf diesem Stadium besteht die Kopfkappe also aus einer äußeren und inneren Membran, zwischen welchen sich eine dünne Schicht von homogenem Material befindet, welche sich von der Substanz des akrosomalen Granulum herleitet. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse haben die Richtigkeit der Ansicht bestätigt, daß sich das Akrosom vom Golgi-Apparat herleitet. Das Akroblast-Bläschen ist kein Kunstprodukt, sondern eine reale Struktur von großer Wichtigkeit im Zuge der Bildung der Kopfkappe.

Die folgende lichtmikroskopische Studie befaßt sich mit der Ausbildung der Kopfkappe bei der Spermiogenese des *Mauswiesels* (*Mustela nivalis* L.). Sie zeigt, daß 1. die Bereitstellung des Akroblast-Materials schon bei den Spermatozyten 1. O. erfolgt, welches über die Präspermatiden zu den Spermatiden weitergegeben wird, und 2., daß den Reifungsphasen der Spermatiden sehr charakteristische morphologische Stadien der Kopfkappenbildung zuzuordnen sind, die in enger Beziehung zur Einpflanzung der Spermienköpfe in die Sertoli-Zellen stehen. Aus den Beobachtungen wird wahrscheinlich, daß die Kopfkappe zunächst schon für die Haftung an den Sertoli-Zellen und nicht nur für die an der Eizelle bedeutungsvoll ist.

2. Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangten die Testes von 4 Mauswieseln (*Mustela nivalis* L.), welche in freier Wildbahn mit Hilfe von Schlupffallen in den Monaten Februar und März lebend gefangen wurden. Die Tiere wurden mit Äther getötet. Fixierung der Gonaden in Bouinscher Lösung. Paraffineinbettung, Schnittfärbung mit Hämatein-Erythrosin, Aldehydfuchsin und Azan (M. Heidenhain). Eine intensiv blaue Anfärbung der Kopfkappe und ihrer Vorstufen im Laufe der Spermiogenese wurde dadurch erreicht, daß die Schnitte bei der Azanfärbung 3 Std im Anilinblau belassen und hierauf entsprechend differenziert wurden.

3. Eigene Beobachtungen

Die nur kurze Zeit dauernde Ranzzeit von *Mustela nivalis* L. (12—14 Tage) ist Ende Februar bis anfangs März. In dieser Zeit findet eine lebhafte Spermiogenese statt. Die Hodenkanälchen sind von einer auffallend dünnen Tunica fibrosa umgeben und lassen im Schnittbild die verschiedensten Phasen der Spermienbildung erkennen, wobei in einem Kanälchenquerschnitt die Reifungsphasen der Spermatiden jeweils gleich sind.

Die Sertoli-Zellen, mit breitem Fuß der Basis aufsitzend, stehen sehr dicht und fassen die säulenförmig angeordneten generativen Zellen zwischen sich. Die chromatinarmen Kerne der Sertoli-Zellen mit einem oder zwei tropfenförmigen

Abb. 1

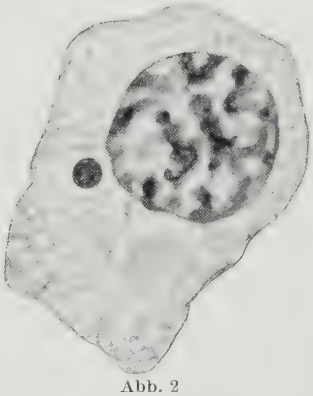


Abb. 2

Abb. 1. Sertoli-Zelle aus dem Hoden des Mauswiesels (*Mustela nivalis* L.) während der Ranzzeit (Schnitt parallel zur Tunica fibrosa). Wolkenförmiger Einschluß in Kernnähe (Bouin, Paraffin 3 μ, Azanfärbung, Ölimmersion, gezeichnet)

Abb. 2. Spermatocyte 1. O. mit Akroblasttropfen und chromatoidem Nebenkörper (Technik wie Abb. 1)

Kernkörperchen sind in der Mehrzahl platt quaderförmig, der Tunica fibrosa angeschmiegt, nur wenige birnenförmig wie die Kerne der menschlichen Sertoli-Zellen. In Kernnähe findet sich ein großer, wolkenartig und unscharf begrenzter Einschluß mit homogenem Inhalt, von dem die sehr deutliche Längsstreifung des Cytoplasmas der Sertoli-Zellen auszugehen scheint (Abb. 1).

Die reichlich vorhandenen Zwischenzellen mit kugeligen Kernen besitzen ein fein vakuoläres Cytoplasma ohne Besonderheiten im Hinblick auf die bekannten Verhältnisse bei Säugern. Den Reinkeschen Kristallen entsprechende Bildungen sind in ihnen nicht zu beobachten.

Die Spermatogonien sind verhältnismäßig sehr spärlich vorhanden, da sie vermutlich gegen Ende der Ranzzeit bis zu einem gewissen Grade „aufgebraucht" sind; nur in einigen Querschnitten der Kanälchen findet man sie reichlicher auf verschiedenen Stadien der Mitose.

An Paraffinschnitten, welche mit Azan gefärbt wurden (Anilinblau-Orange, 3 Std und entsprechende Differenzierung), war die Ausbildung der Kopfkappe bei den verschiedenen Reifungsphasen der Spermatiden wegen ihrer intensiv blauen Anfärbung ausnehmend gut erkennbar und machte die Zurückverfolgung des gleichartig gefärbten Akroblast-Materials von den Spermatiden über die Präspermatiden bis zu den Spermatocyten 1. O. möglich. Es erwies sich in Über-

einstimmung mit den Untersuchungen von Gatenby und Beams (1935), daß das Material für die Kopfkappenbildung nicht erst ein Produkt der Spermatiden, sondern des Golgi-Apparates der Spermatocyten 1. O. ist und ganz offensichtlich bei den Reifeteilungen ähnlich den Mitochondrien aufgeteilt und weitergegeben wird. Damit wurde gleichzeitig das Problem aufgeworfen, wie sich der Akroblast bei den Reifeteilungen verhält.

Der Akroblast — wir verstehen darunter den Golgi-Apparat und das in seiner unmittelbaren Nachbarschaft bereitgestellte Material für die Bildung der Kopfkappe des ausdifferenzierten Spermiums — tritt uns regelmäßig bereits in der Spermatocyte 1. O. als eine große, mit kolloidartigem Inhalt gefüllte Vakuole entgegen (Abb. 2). Möglicherweise ist der Vorläufer dieses Materials auch schon in den Spermatogonien vorhanden, in denen in Kernnähe unscharf begrenzte blaue Tröpfchen zu erkennen sind. Der Kolloidtropfen in den Spermatocyten 1. O ist durch seine Größe und intensive blaue Anfärbung auffallend; sein Durchmesser erreicht ein Drittel des Durchmessers eines Spermatocytenkernes. Der Akroblasttropfen ist scharf begrenzt und scheint von einer dünnen Hülle umgeben zu sein. In dem im übrigen homogen blaugefärbten Inhalt sind mehrere kleine, kugelförmige Aufhellungen zu erkennen. Das Gebilde liegt immer in unmittelbarer Nähe des Zellkernes, wo auch die chromatoiden Nebenkörper sich finden, die sich aber mit dem Azokarmin rötlich anfärben; es kann die Kernmembran nahezu berühren. Eine bevorzugte Orientierung kann man nicht feststellen, d.h. man findet den Akroblasttropfen das eine Mal in der basalen Zellhälfte, das andere Mal in der lumenseitigen oder aber seitlich vom Kern, d.h. es sind alle Positionen um den Kern anzutreffen (Abb. 3). Ebenso ist eine konstante räumliche Beziehung zu dem oder den chromatoiden Nebenkörpern nicht augenscheinlich, es sei denn, daß einer zumindest in der Nähe des Akroblasten gelegen ist. Das Fehlen des Akroblasten in manchen Spermatocyten ist lediglich durch die Schnittführung vorgetäuscht. *Die Akroblasttropfen sind somit obligate Bestandteile der Spermatocyten 1. O.*, auch jener, welche bereits in die Prophase der ersten Reifeteilung eingetreten sind und eine Kernmembran bereits vermissen lassen. Seiner Größe und Struktur nach kann der Akroblast durchaus als ein Produkt des Golgi-Apparates aufgefaßt, nicht aber mit ihm identifiziert werden.

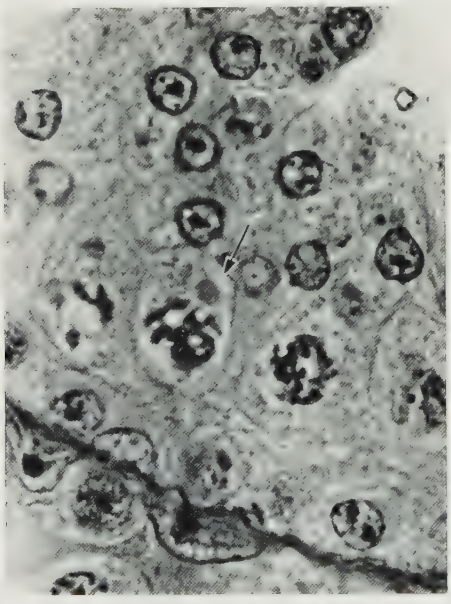


Abb. 3. Ausschnitt aus einem Hodenkanälchen vom Mauswiesel. Spermatocyte 1. O. mit Akroblasttropfen (Pfeil). Die Kernmembran ist aufgelöst. Zahlreiche Spermatiden V mit großem Chromatinbrocken im Zentrum des Kernes und aufgelagertem Akrosom-Granulom (Zeiss-Photomikroskop, Ölimmersion)

Das Schicksal des Akroblasttropfens während der Metaphase und Anaphase im Zuge der 1. Reifeteilung ist schwer zu beurteilen, weil er offenbar in feine

Tröpfchen zerlegt wird, welche dann sichelförmig an der Oberfläche des Chromosomenkonvolutes auseinandergezogen sind. Die Kleinheit der Tröpfchen und ihre Färbung läßt sie aber lichtmikroskopisch nicht mehr mit Sicherheit von den Mitochondrien unterscheiden. Auch Fawcett und Burgos (1956) führen aus, daß der Akroblast bei der Teilung in feine Granula zerlegt wird, welche sich beiderseits an der Innenseite der Spindel finden. Man kann sich hypothetisch vorstellen, daß sie dann nach der Zellteilung wieder in Kernnähe der Präspermatiden bzw. Spermatiden kondensiert werden und als singuläre Akroblasttropfen erscheinen.

Bei den Präspermatiden wird jedenfalls der kugelige Akroblasttropfen wieder in Kernnähe sichtbar und nähert sich der Kernmembran fast bis zur Berührung (Abb. 4). Der Zellkern der Präspermatiden hat zum Unterschied von dem der unreifen Spermatiden noch eine gleichmäßige, deutlich dichtere Chromatinverteilung. Es liegt in den zeitlichen Bedingungen der Reifeteilungen begründet, daß die Stadien der Präspermatiden relativ spärlich anzutreffen sind, doch haben wir gelegentlich einen ganzen Kanälchenquerschnitt mit zahlreichen Präspermatiden gefunden.

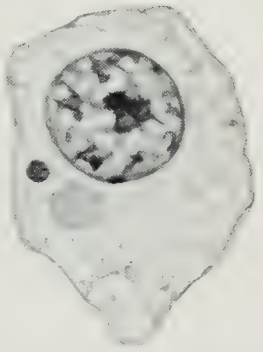


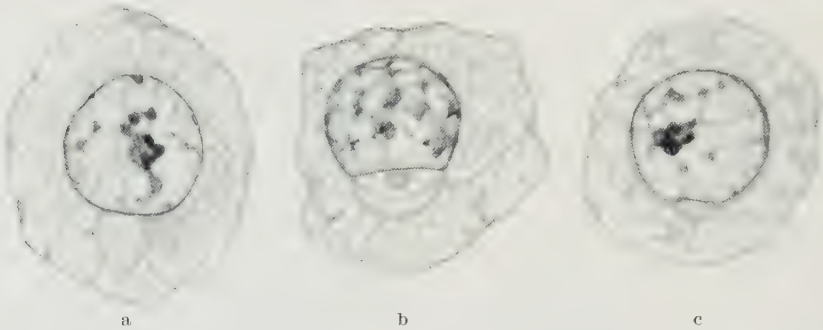
Abb. 4. Präspermatide mit paranukleärem Akroblasttropfen (Technik wie Abb. 1)

Groß ist der Formenreichtum der *Spermatiden*, den Phasen der Reifung entsprechend. Doch lassen sie sich mit Hilfe der Kernform und Kernstruktur und insbesondere durch die Differenzierung und Ausbildung der Kopfkappe gut in ihre Entwicklungsreihe einordnen. Aus Gründen der Zweckmäßigkeit und der besseren Verständigung unterscheiden wir bei der Reifung der Spermatiden auf Grund morphologischer Kriterien 7 Stadien (vgl. auch Abb. 10): Die unmittelbar aus der letzten Reifeteilung hervorgegangenen unreifen kugeligen *Spermatiden I* besitzen einen runden Kern mit sehr lockerem Chromatingerüst, das nur im Zentrum einen oder mehrere grobe Brocken aufweist. Der Kernmembran ist an einer Stelle ein großer Tropfen oder Doppeltropfen angelagert, der Akroblast (Abb. 5a) und bedingt eine angedeutete Abplattung der Kernmembran. Damit ist erstmalig der vordere Pol des späteren Spermiums markiert, denn es wird der Kontakt mit der Kernmembran nicht mehr aufgegeben.

Beim nächsten Stadium, der *Spermatide II*, ist insofern eine Veränderung eingetreten, als der kugelige oder leicht ovoide Zellkern im Bereiche der Kontaktfläche stark abgeplattet oder sogar wannenförmig eingedellt ist, als wäre eine Kalotte abgeschnitten. An dieser „Plattform" ist der Akroblast als Kugelkalotte der Kernmembran unmittelbar aufgelagert, gleichsam die verlorene Rundung wieder ergänzend. Gleichzeitig hat auch eine Differenzierung eingesetzt. Der Akroblast sitzt der Kernplattform wie eine Glocke auf. Seine äußere sichelförmige Kontur ist dichter und intensiv blau gefärbt, während der Binnenraum der Glocke optisch leer oder nur zart blau tingiert erscheint. Der Plattform des Kerns angelagert findet man im Zentrum das große intensiv blau gefärbte Akrosom-Granulum (Abb. 5b). Die im Schnitt sichelförmige Glocke kann auch zipfelförmig ausgezogen sein; sie entspricht dem Golgi-Komplex (Gatenby und Beams, Fawcett und Burgos). Er wird in einem nächsten Schritt der Entwicklung losgelöst. In dem zentralen blauen Tropfen haben wir das Akrosom-

Granulum vor uns, während das optisch leere oder zartblau tingierte Innere der Glocke das Akrosombläschen darstellt (s. S. 115).

Bei den *Spermatiden III* findet man das Akroblastmaterial bereits als Kopfkappe auf der ganzen vorderen Oberfläche des noch immer kugeligen, aber oft schon exzentrisch liegenden Zellkerns ausgebreitet (Abb. 5c). Die Kernstruktur der Spermatide III hat noch immer den Charakter der frühen Spermatiden mit spärlichem zartem Chromatingerüst und einem nahe dem Zentrum liegenden groben Brocken. Die Zellgrenzen sind gut erkennbar, der Kern ist allseits von Cytoplasma umgeben. In der Art der Aneinanderlagerung ist in der Regel der Epithelcharakter gewahrt. Der früher glockenförmige Akroblast hat sich in eine



a b c

Abb. 5. a Erstes Spermatidenstadium *(Spermatide I)* mit kugeligem Kern und angelagertem doppeltem Akroblasttropfen. b *Spermatide II* mit glockenförmigem Akroblasten, einer Kernplattform anliegend mit Akrosom-Granulum und Akrosombläschen. c *Spermatide III*. Das Akrosommaterial hat sich auf die Hälfte der Kernoberfläche ausgebreitet. Akrosom-Granulum am vorderen Pol knopfartig vorspringend

dünne, aber intensiv gefärbte Kopfkappe verwandelt, welche die vordere Oberfläche des Kerns bis zum Äquator bedeckt. Sie besitzt am vorderen Pol eine knopfartig vorspringende Verdickung, welche die Kernmembran eindellt und das Akrosom-Granulum repräsentiert. Die Ausbreitung des Kopfkappenmaterials muß ein aktiver Vorgang sein, da sich die Größe des Kerns nicht verändert hat. Es ist eine Frage für sich, in welcher Weise die Haftung an der Kernoberfläche im Zuge der Ausbreitung verwirklicht wird. In der Nähe des hinteren Poles des Zellkerns findet man in der Regel die 2 Zentriolen dort, wo sich die Hauptmasse des Cytoplasma auszubreiten beginnt.

Bei den unreifen Formen der Spermatiden I—III ist eine bestimmte Orientierung des vorderen Poles etwa zum Lumen oder zur Basis des Kanälchens oder zu benachbarten Sertoli-Zellen nicht erkennbar, sie wird erst auf einem späteren Stadium deutlich. Die anschließende weitere Ausbildung der Kopfkappe geht nunmehr mit eingreifenden Änderungen der Kernform und Kernstruktur Hand in Hand.

Die *Spermatiden IV* unterscheiden sich von den vorigen aber nicht nur durch Kernform und Kernstruktur und die Ansammlung des Cytoplasmas am hinteren Kernpol, sondern durch das Freiwerden des vorderen Kopfteils von Cytoplasma überhaupt, sowie durch die weiter fortschreitende Ausbreitung der Kopfkappe nach hinten (Abb. 6a). Der Kern bleibt in der vorderen Hälfte kugelig, nimmt indessen in der hinteren Hälfte einen trapezförmigen Umriß an, so daß er der

Gestalt einer Birne ähnelt. Das Chromatingerüst verwandelt sich in eine verwaschene Grundsubstanz bis auf ein bis zwei Brocken, welche färbbar bleiben. Die Kopfkappe greift über den Äquator hinaus nach hinten, nun etwa zwei Drittel des Kernes umhüllend. Der vom Akrosom-Granulum herrührende knopfförmige Vorsprung am vorderen Pol ist unverändert. Das Cytoplasma hat sich ganz und gar an den hinteren Umfang des Kernes zurückgezogen und verbreitert sich vom Äquator aus beutelförmig, sich dabei in das Lumen des Kanälchens vorwölbend. Der Beginn der Bildung des Spermienhalses am hinteren Kernpol ist mehr oder weniger angedeutet. Ob auch der vordere Kernumfang noch von der Plasmamembran der Zelle überzogen wird oder nicht, ist lichtmikroskopisch nicht zu entscheiden.

Abb. 6. a *Spermatide IV*. Kern birnenförmig, Cytoplasma beutelförmig, die Kopfkappe reicht über den Äquator hinaus. b *Spermatide V*. Kopfumriß Papierdrachenform, Akrosom-Granulum vorspringend, in Sertoli-Zelle eingedrungen

Bei den weiter entwickelten *Spermatiden V* ist der Umriß des von Cytoplasma weitgehend freien Kopfes von der Fläche gesehen fünfseitig (Papierdrachenform), vom Profil etwas abgeflacht (Abb. 6 b, 10). Die Kopfkappe hat vorne eine deutliche Spitze. Das Kerngerüst ist hell verwaschen mit kleinen,

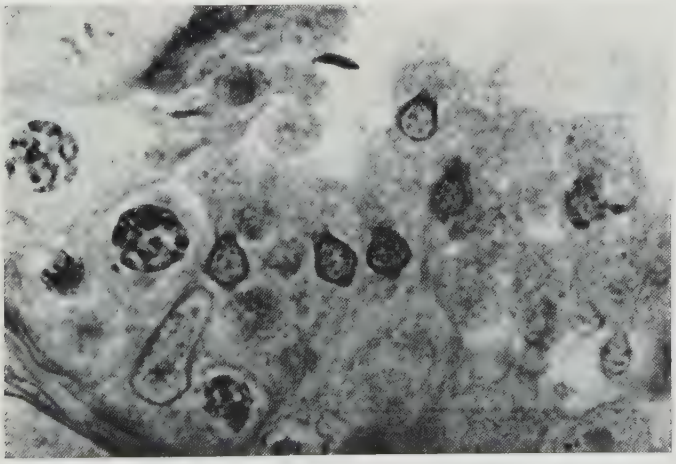


Abb. 7. *Spermatiden V* mit der Kopfkappe in Sertoli-Zelle steckend und zu diesen orientiert (Photomikroskop Zeiss, Ölimmersion)

noch schwach färbbaren Partikeln. Der Kopf steckt nun deutlich erkennbar in einer Sertoli-Zelle. An seiner Basis hat sich, beutelförmig gegen das Lumen des Samenkanälchens vorragend, das Cytoplasma angesammelt mit einer kurzen

Schwanzmanschette und einem zentralen Faden. Die charakteristische Kopfform der Spermatiden V, das Akrosom-Granulum, der Beginn der Halsbildung usw., sind in der Abb. 7 deutlich zu erkennen.

Als *Spermatiden VI* bezeichnen wir ein fließendes Übergangsstadium zum morphologisch ausdifferenzierten Spermium, bei dem in der Hauptsache die Ausdifferenzierung von Hals, Mittelstück und Schwanz abläuft und vollendet wird

Abb. 8. a *Spermatide VI* von der Fläche gesehen. b *Spermatide VI* vom Profil. c *Spermatide VII*, morphologisch ausdifferenziertes, in einer Sertoli-Zelle steckendes Spermium

(Abb. 8a und b). Aber auch der Kopf hat sich wiederum verändert. Von der Fläche gesehen sind die Ecken abgerundet, eine Chromatinstruktur ist nicht mehr erkennbar. Der Kopf ist zum größten Teil von der Kopfkappe überzogen, die am vorderen Umfang als Perforatorium weit vorspringt. Vom Profil gesehen ist er stark abgeplattet, einer Pfeilspitze nicht unähnlich.

Als *Spermatiden VII* bezeichnen wir die morphologisch ausdifferenzierte Form, also das mit der Sertoli-Zelle noch in Kontakt befindliche Spermium (Abb. 8c). Die Kopfkappe umhüllt gut 2 Drittel des Kopfes, dessen Umriß sich gegenüber dem vorherigen Stadium insofern wieder verändert hat, als die Ecken

noch mehr abgerundet erscheinen und der homogen orange gefärbte Kopf im vorderen Umfang wieder breiter geworden ist. Die Kopfkappe steht als breiter Saum weit nach vorne vor, weniger weit seitlich über. Jene knopfartige Spitze des Akrosoms am vorderen Pol ist verschwunden; sie wurde in die Konvexität der Kopfkappe einbezogen. Die hintere Kante der Kopfkappe ist gut erkennbar und verläuft in einer leichten Wellenlinie quer über den Kopf hinweg. Hals, Mittel-

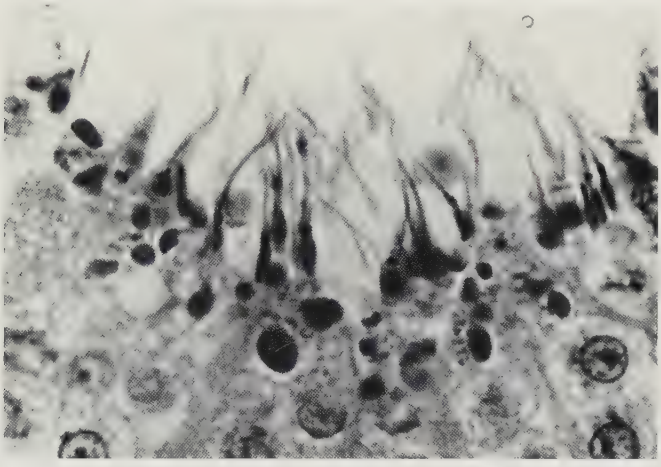


Abb. 9. Ausschnitt aus einem Hodenkanälchen des Mauswiesels mit großen und kleinen Kolloidtropfen in der lumennahen Zone

stück und Schwanz sind ausdifferenziert. An Querschnitten des Kopfes kann man je nach der Schnittebene solche mit und ohne blauer Umhüllung auffinden. Bei dem morphologisch ausdifferenzierten Spermium ist es wahrscheinlich durch Quellung zu einer Volumszunahme der Kopfkappe im Vergleich zu den früheren Stadien gekommen, so daß die Färbbarkeit geringer ist.

In jenen Kanälchenquerschnittchen, in denen der Rand des Lumens von ausdifferenzierten Spermien dicht besetzt ist, die in Sertoli-Zellen stecken, findet man in einer basalwärts von den Spermienköpfen gelegenen Zone zahlreiche große und kleine orange gefärbte Kolloidtropfen. Sie sind zum Teil größer, zum Teil kleiner als die Spermienköpfe und intensiv orange gefärbt. Vermutlich handelt es sich um die Köpfe von degenerierenden Spermien (Abb. 9).

4. Erörterung der Befunde

Unsere Untersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit den neueren Ergebnissen von Gatenby und Beams (1935) und von Fawcett und Burgos (1956), daß das Bildungsmaterial für die Kopfkappe, der „Akroblast", bereits in der Spermatocyte 1. O., möglicherweise schon in den Spermatogonien vorhanden ist. Der Akroblast entspricht dem Golgi-Apparat, freilich in einer besonderen Ausprägung (Fawcett und Burgos). Das Bildungsmaterial für die Kopfkappe wird im Zuge der Reifeteilungen aufgeteilt und weitergegeben, so daß es sowohl bei den Präspermatiden als auch bei den frühesten Spermatiden als tropfenförmiges Gebilde in Kernnähe wiederzufinden ist. Die beiden spezifischen Strukturbestandteile der sich entwickelnden Kopfkappe der frühen Spermatiden sind das

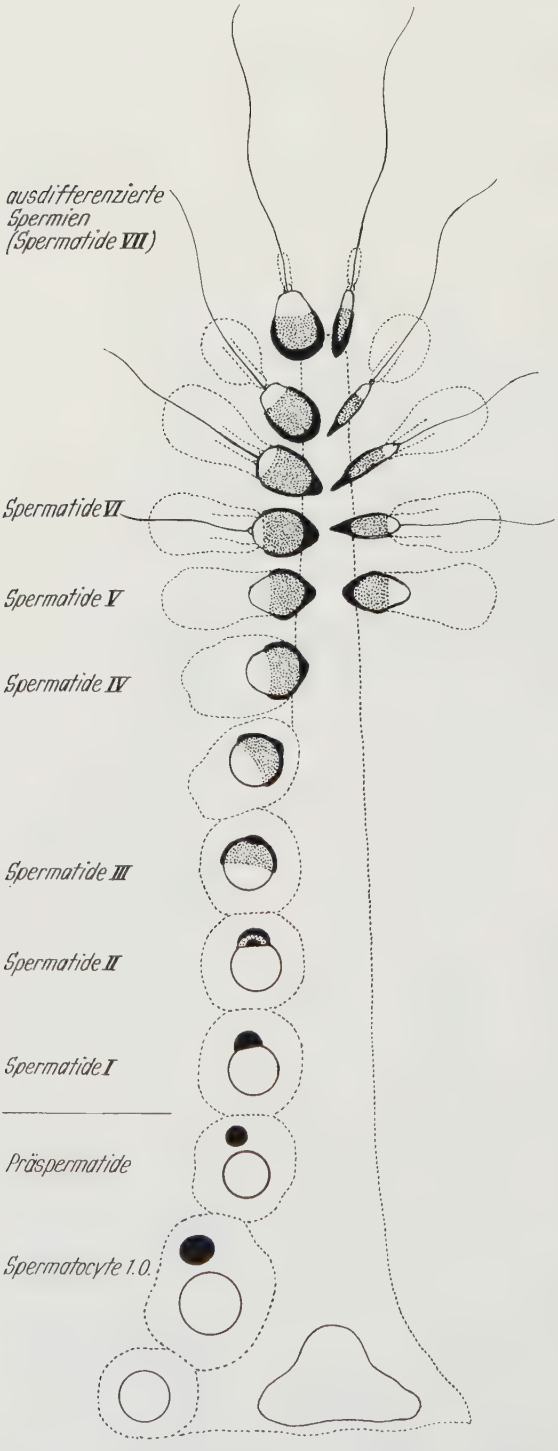


Abb. 10. Schema der Differenzierung des Kopfkappenmaterials und der Ausbildung der Kopfkappe im Zuge der Spermienentwicklung beim Mauswiesel. Rechts oben Profilansichten der entsprechenden Stadien auf der linken Seite

mit Flüssigkeit erfüllte Akroblastbläschen und das der Kernplattform intravesikulär angelagerte Akrosom-Granulum. Beide Bildungen sind Produkte des Golgi-Apparates, der offenbar nach Erfüllung dieser Aufgabe mit Teilen des Cytoplasma verlorengeht und an der weiteren Differenzierung des Spermiums nicht mehr beteiligt zu sein scheint. So gesehen, ist die *Kopfkappe ein Sekretionsprodukt der Zelle*, an dessen Synthese und Kondensation der Golgi-Apparat einen wesentlichen Anteil hat, formal vergleichbar mit den Prosekretvakuolen etwa der Speicheldrüsen. Der Unterschied liegt (abgesehen von der substantiellen Zusammensetzung) aber darin, daß dieses Sekretionsprodukt nicht nach außen abgegeben wird, sondern ein funktioneller Bestandteil an der Zelloberfläche bleibt. Was mit der Kopfkappensubstanz nach der Imprägnation der Eizelle und nach der Vereinigung der Vorkerne geschieht, ist nicht bekannt.

Ob die Kopfkappe der morphologisch ausdifferenzierten Spermien noch von einer dünnen Plasmamembran der Zelle überzogen wird, wofür sich Fawcett und Burgos aussprechen, oder nicht, bedarf weiterer elektronenmikroskopischer Untersuchungen. Jedenfalls ist bis zum Stadium der Spermatide III, bei dem die Kernoberfläche schon zur Hälfte von dem Kopfkappenmaterial eng überzogen wird, der Kern noch allseits von

Cytoplasma umgeben (Abb. 10). Erst bei der Spermatide IV erreicht die Kopfkappe die Oberfläche und ist lichtmikroskopisch nicht mehr von Cytoplasma bedeckt. Das Sekretionsprodukt gelangt somit gleichsam durch den Rückzug des Cytoplasma an die Oberfläche. Auf dem gleichen Stadium wird die Beziehung der Spermatiden zu den Sertoli-Zellen evident.

Auf Grund dieser Beobachtungen möchten wir vermuten, daß die Kopfkappe nicht nur für die Haftung an der Eizelle usw., sondern in gleicher Weise für die Haftung bzw. das Eindringen in die Sertoli-Zellen von großer Bedeutung ist, fällt doch die Entblößung der Kopfkappe von Cytoplasma in auffallender Weise mit der Einpflanzung in die Sertoli-Zellen entwicklungsmäßig zusammen.

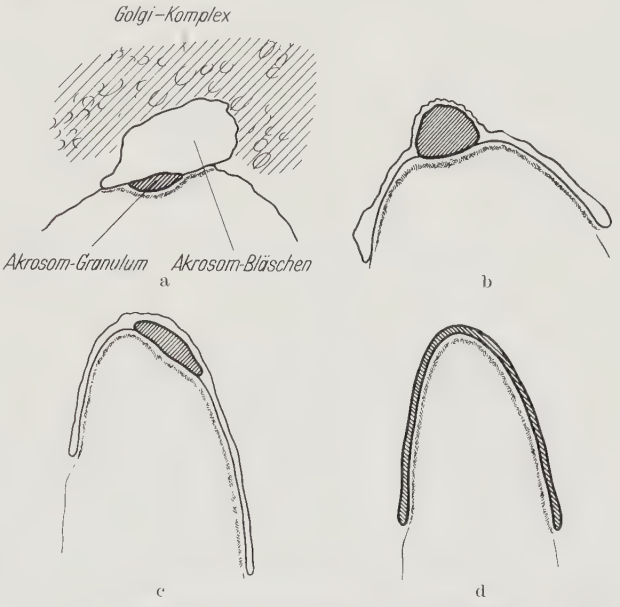


Abb. 11a–d. Schema der Differenzierung der Kopfkappe von Spermatiden des Menschen nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Fawcett und Burgos

Die schematische Abbildung der Spermiohistogenese im Lehrbuch von Fischel (1929, Abb. 20), die in viele Lehr- und Handbücher übernommen wurde, ist in bezug auf die Ausbildung der Kopfkappe unrichtig. Nach den Schemata würde sich das Kopfkappenmaterial der Spermatiden, das auf dem Stadium b Dreiviertel des Kernes in einigem Abstand von der Oberfläche umgibt, später verkleinern und zurückziehen, so daß auf dem Stadium d nur mehr die Hälfte des Kernes umfangen wird. Gerade das Gegenteil ist der Fall und die Auflage der Kopfkappe auf der Kernoberfläche ist schon in den frühesten Stadien der Spermatiden evident.

Das Eindringen der reifenden Spermatiden in das Cytoplasma der Sertoli-Zellen erfolgt nur im Bereich der Kopfkappe und, wie schon erwähnt, erstmalig bei jenem Stadium der Differenzierung, bei dem die Kopfkappe durch den Rückzug des Cytoplasma an die Oberfläche gelangt ist. Während man bei den frühen Spermatidenstadien (I—III), bei denen der Zellkern und die Kopfkappe auf ihm noch allseits von Cytoplasma umgeben ist, keinerlei Orientierung und Ausrichtung des durch den knopfförmigen Vorsprung des Akrosom-Granulum markierten vorderen Poles erkennen kann, d.h. das Akrosom-Granulum alle Uhrzeigerstellungen einnehmen kann, ist eine Orientierung der Spermatiden IV—VII zu den Sertoli-Zellen ganz augenscheinlich. Die vorderen Pole oder die vordere Hälfte der Spermatidenköpfe haben sich so gedreht, daß sie alle zur nächstliegenden Sertoli-Zelle hingewendet und in diese eingepflanzt sind. Wenn man auch dem

mikroskopischen Bild einen dynamischen Vorgang nicht entnehmen kann, so möchten wir doch vermuten, daß die Einpflanzung ein an die Ausbildung der Kopfkappe gebundener aktiver Vorgang ist.

Zusammenfassung

1. Der *Akroblast*, aus dem das Material für die Kopfkappe der Spermien hervorgeht, ist wahrscheinlich schon in den Spermatogonien, mit Sicherheit in den Spermatocyten I. O. und in den Präspermatiden nachzuweisen. Er entspricht dem Golgi-Apparat und wird bei den Reifeteilungen aufgeteilt und weitergegeben.

2. Bei den ersten Stadien der Spermatiden I und II tritt er uns zuerst als großer kernnaher Tropfen und dann als Akroblastglocke entgegen. Der Hohlraum der Glocke entspricht dem Akroblastbläschen, welches in der Mitte der Kernplattform das Akrosom-Granulum enthält. Akroblast-Bläschen und -Granulum bilden die Kopfkappe.

3. Bei den Spermatiden III umhüllt die aus dem Akroblastbläschen und dem Akroblast-Granulum entstandene, noch allseits von Cytoplasma umgebene Kopfkappe bereits die vordere Hälfte der Kernoberfläche, deren vorderer Pol durch das Akroblast-Granulum markiert wird.

4. Durch Zurückweichen des Cytoplasmas vom vorderen Kernumfang wird, mit dem Stadium IV beginnend, die Kopfkappe frei, während gleichzeitig der von der Kopfkappe umhüllte Teil des Spermatidenkopfes in die Sertoli-Zelle eindringt. Erst von diesem Moment an ist eine Orientierung der Spermatidenköpfe bzw. ihrer Axe evident.

5. Die Kopfkappe ist vermutlich für das Eindringen der Spermatidenköpfe in die Sertoli-Zellen und für den Stoffaustausch von Bedeutung.

Literatur

Ånberg, A.: The ultrastructure of the human spermatozoon. Acta obstet. gynec. scand. **36**, Suppl. 2 (1957).

Bargmann, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Branca, A.: Les canalicules testiculaires et la spermatogénèse de l'homme (Etude cytologique). Arch. exp. gén. Zool. **62**, 53—252 (1924).

Fawcett, D. W., and M. H. Burgos: Observations of the cytomorphosis of the germinal and interstitial cells of the human testis. Ciba Foundation Coll. Ageing **2**, 86—99 (1956).

Fischel, A.: Lehrbuch der Entwicklung des Menschen. Wien u. Berlin: Springer 1929.

Flemming, W.: Beiträge zur Kenntnis der Zelle und Lebenserscheinungen. Teil 2. Arch. mikr. Anat. **18**, 151—259 (1880).

Gatenby, J. B., and H. W. Beams: The cytoplasmic inclusions in the spermatogenesis of man. Quart. J. micr. Sci. **78**, 1—29 (1935).

Gresson, R. A. R.: A study of the male germ-cells of the rat and the mouse by phase-contrast microscopy. Quart. J. micr. Sci. **91**, 73—78 (1950).

Hamilton, W. J., J. D. Boyd and H. W. Mossmann: Human embryology. Cambridge: Heffer & Sons 1957.

Hirschler, J.: Studien über die Plasmakomponenten (Golgi-Apparat u.a.) an vital gefärbten männlichen Geschlechtszellen einiger Tierarten. Z. Zellforsch. **7**, 62—82 (1928).

Maximow, A. A., and W. Bloom: A textbook of histology. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company 1939.

Meves, F.: Zur Entstehung der Achsenfäden menschlicher Spermatozoen. Anat. Anz. **14** 168—170 (1898).

— Über das Verhalten der Zentralkörper bei der Histogenese der Samenfäden von Mensch und Ratte. Anat. Anz. **14**, Erg.-H., 91—100 (1898).

— Struktur und Histogenese der Spermien. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **11** (1901).

Papanicolaou, G. N., and C. Stockard: The development of the idiosome in the germ cells of the male Guinea-pig. Amer. J. Anat. **24** (1918).

Schaffer, J.: Lehrbuch der Histologie und Histogenese, 3. Aufl. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1933.

Stieve, H.: Männliche Genitalorgane. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. v. Möllendorff, Bd. VII/2. Berlin: Springer 1930.

Prof. Dr. H. Ferner, Histologisches Institut der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

Zeitschrift für Zellforschung 54, 118—146 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. med. et phil. E. Horstmann)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER STRUKTURELLEN VERÄNDERUNGEN IM RINDENBEREICH DES AMPHIBIENEIES IM OVAR UND NACH DER BEFRUCHTUNG

Von

Hubert Wartenberg und Walter Schmidt

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. November 1960)

Einleitung

In früheren Arbeiten haben wir den Aufbau des Rindenbereiches der Amphibienoocyte untersucht (Wartenberg 1959, Wartenberg und Gusek 1960a, b). Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse hatten aber keine befriedigende Antwort auf die Frage ergeben, in welcher Weise der Rindenbereich während der ovariellen Entwicklung und im Zeitraum nach der Befruchtung bis zur Furchung verändert wird. Dabei interessierte der als Zona radiata bezeichnete Rindenabschnitt der Oocyte und seine Beziehungen zu dem später gebildeten Dotterhäutchen. Weiterhin sollte das Verhalten gewisser subkortikaler Granula oder Vakuolen beobachtet werden, in denen Mucopolysaccharide histochemisch nachgewiesen worden waren (Wartenberg 1956, 1959). Außerdem wollten wir auf diesem Wege versuchen, etwas über die Struktur und die Entstehung des Holtfreterschen „surface coat" zu erfahren. Nach Holtfreter (1943a, b) entsteht diese Bildung, nachdem das Ei den Ovidukt durchwandert hat; sie soll aber schon vor der Befruchtung vorhanden sein und später im Blastula- und Gastrulastadium als ein „syncytialer Mantel" den Keim zusammenhalten.

Material und Methode

Um die Oocyten verschiedenen Reifegrades zu gewinnen, entnahmen wir dem dekapitierten Tier *(Rana temporaria)* ein Ovar und fixierten Teile davon 30 min lang in isotonischer, gepufferter 1%iger OsO_4-Lösung (Rhodin 1954) bei p_H 7,2 . Die gewünschten Oocytenstadien konnten unter der binokularen Lupe herausgetrennt werden und einzeln 2 Std in eisgekühlter Lösung fixiert werden. Das übrige Material wurde durch künstliche Befruchtung in der von Romeis (1948, S. 547) angegebenen Weise gewonnen. Unbefruchtete Eier entnahmen wir dem Uterus sofort nach Öffnen des Tieres. Bei allen Eiern entfernten wir nach 1stündiger OsO_4-Einwirkung die Gallerthülle und fixierten die Eier anschließend eine weitere Stunde.

Das Material für die Untersuchungen an Tritoneiern *(Triton alpestris)* wurde in der gleichen Weise gewonnen, mit dem Unterschied, daß normal abgelaichte Eier verwendet und die Gallerthülle *vor* der Fixierung entfernt wurde. Nach Einbettung über Alkohol und Aceton in Methacrylat (Methylester: Butylester = 1:3) wurden die Schnitte auf einem Porter-Blum-Ultramikrotom hergestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Elektronenmikroskop Typ Elmiskop I bei 80 kV gemacht.

Untersuchungsergebnisse

1. Verhältnisse während der ovariellen Entwicklung

a) Zona radiata mit Mikrovilli und Follikelepithel. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Amphibienoocyten eines sehr frühen Stadiums *(Rana pipiens)* liegen von Kemp (1956a, b) vor; etwas ältere Stadien (Zeitpunkt der Pigmentbildung, *Rana esculenta*) wurden von uns untersucht (Wartenberg und Gusek 1960a, b). In beiden Fällen konnte die Struktur

der Zona radiata (Rindenhaut) geklärt werden: In eine nur leicht strukturierte „Grundsubstanz" liegen zahlreiche Mikrovilli der Oocyte und einzelne Fortsätze der Follikelzellen eingebettet. Die „Grundsubstanz" der Zona radiata — nach histochemischen Befunden ein neutral reagierender Mucopolysaccharidkomplex (Wartenberg 1959) — nimmt mit fortschreitender Reifung des Eies an Menge zu, so daß die Mikrovilli schließlich nur noch den inneren Bereich einnehmen.

Von Dollander (1956) wurde die elektronenmikroskopische Struktur der Urodelenoocyte (*Triton alpestris* und *T. helveticus*) beschrieben. Er findet ebenfalls Mikrovilli, die „in die innere Partie des Chorions hineinragen". Der Autor vergleicht diesen Aufbau mit dem der „zone fibrillaire", welcher von Chaudhry (1956) an Teleosteern erkannt wurde.

Ähnliche Verhältnisse wurden bei der Säugeroocyte von Yamada, Muta, Motomura und Koga (1957) am *Mäuseei*, von Sotelo und Porter (1959) und von Odor (1960) am *Rattenei*, von Trujillo-Cenóz und Sotelo (1959) am *Kaninchenei* gefunden. Die Zona pellucida enthält zahlreiche fingerförmige Mikrovilli von seiten der Oocyte und einzelne lange Fortsätze der Follikelzellen, die z.T. die Mikrovilli oder die Eioberfläche zwischen den Mikrovilli berühren, aber *niemals in kontinuierlichem, syncytialem Zusammenhang mit dem Ei stehen*. Auch die *menschliche Oocyte* zeigt diese Struktur (Wartenberg und Stegner 1960).

Bei unseren Untersuchungen wurden Ovarialeier unterschiedlicher Reife herangezogen. Im Rindenbereich der heranwachsenden Oocyte vom Grasfrosch *Rana temporaria* bilden kurze, fingerförmige Mikrovilli gemeinsam mit einzelnen, z.T. verzweigten Fortsätzen der Follikelzellen eine noch recht dünne, an Grundsubstanz arme „Zona radiata"[1]. Das Follikelepithel bedeckt mit 3 Schichten die Eioberfläche, wobei die Zellagen durch jeweils eine Basalmembran voneinander getrennt sind. Die Basalmembran zwischen oberflächlicher und mittlerer Schicht ist relativ dünn (250—500 Å), während die Membran zwischen mittlerer und tiefer Schicht kräftiger entwickelt ist (1000—1500 Å). Beide Basalmembranen sind der oberflächlichen bzw. tiefen Zellage zugeordnet, indem sie den Plasmalemmata der jeweiligen Zelle dicht anliegen, von der mittleren Zellschicht aber durch einen mehr oder weniger breiten, Gitterfasern enthaltenden Interzellularspalt getrennt sind.

Die Oocyte wächst heran und die Zona radiata nimmt an Breite zu. Dabei vermehrt sich vor allem die Grundsubstanz, so daß nur noch die innere Hälfte von den Mikrovilli eingenommen wird. Die Grundsubstanz besteht aus einer Menge dicht gelagerter und unscharf begrenzter Balken, die z.T. radiär angeordnet sind, z.T. tangential verlaufen und damit eine Art Flechtwerk bilden (Abb. 1, 2). Zwischen diesen relativ dichten Anteilen findet man bei hoher Auflösung feine subfibrilläre Elemente (Abb. 2). Gegen das Plasmalemm der Follikelzelle schließt die Zona radiata mit einer unregelmäßig begrenzten, aber in sich homogenen Schicht von Grundsubstanz ab. Aus den Ergebnissen histochemischer Reaktionen kann man schließen, daß die gesamte Grundsubstanz neutrale Mucopolysaccharide enthält (Wartenberg 1959).

Ist die Eizelle im Ovar vollkommen ausgereift, d.h. hat sie ihre maximale Größe erreicht, dann bietet die Rindenhaut ein anderes Bild (Abb. 3). Die enge Verbindung mit der Eioberfläche ist durch Rückbildung der Mikrovilli gelöst, das Plasmalemm schließt die Oocyte fast glatt gegen die Rindenhaut ab. Zwar findet man noch häufig kleine warzen- oder fingerförmige Ausstülpungen des Plasmalemms, doch ragen diese in einen Spalt hinein, der sich als ein in der Struktur gelockerter Bereich zwischen Eioberfläche und eigentlicher Rindenhaut

[1] Siehe Anmerkung auf S. 137.

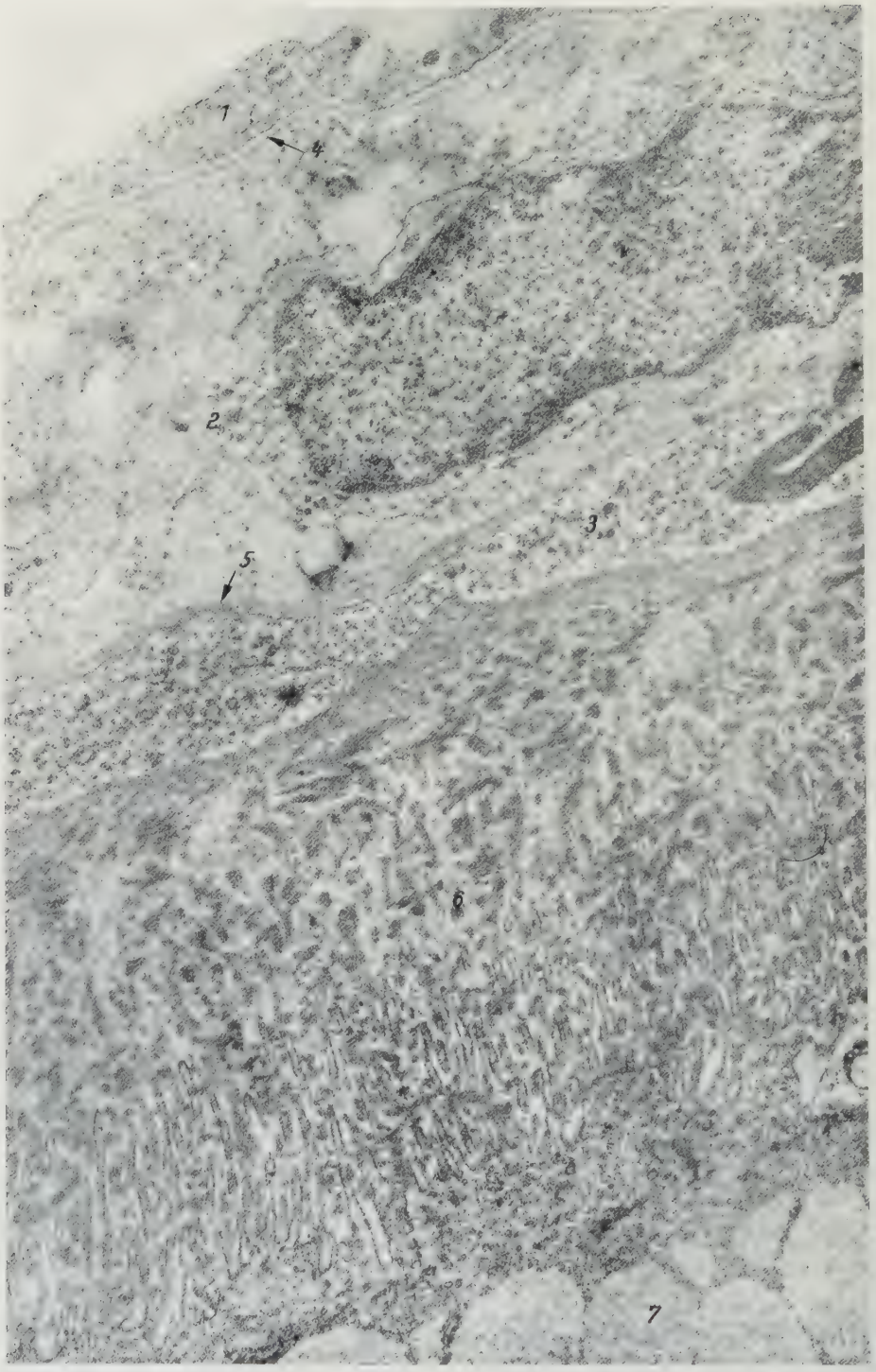


Abb. 1. Junge Oocyte von *Rana temporaria*. *1* Äußere Schicht des Follikelepithels = Peritoneum; *2* mittlere Bindegewebsschicht; *3* tiefe Schicht = eigentliches Follikelepithel; *4* Basalmembran I; *5* Basalmembran II; *6* Zona radiata mit Mikrovilli in der inneren Hälfte; *7* subkortikale Polysaccharidvakuolen im Rindencytoplasma des Eies. Vergr. 16 200mal

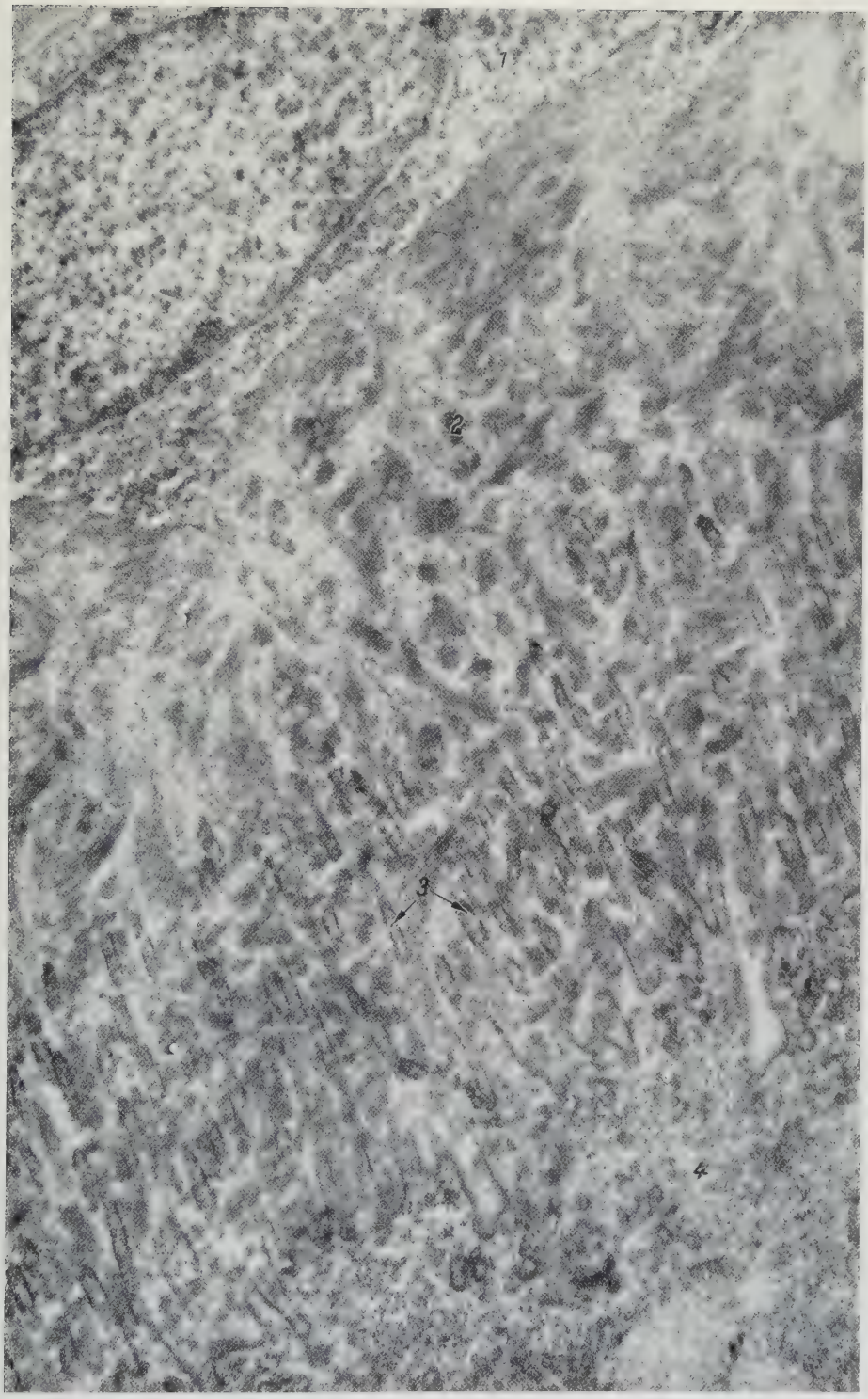


Abb. 2. Zona radiata einer wachsenden Oocyte von *Rana temporaria*. *1* Follikelepithel mit Kern; *2* micellares Flechtwerk der Grundsubstanz mit z. T. sehr feinen Fibrillen; *3* Mikrovilli der Eioberfläche; *4* Rindencytoplasma der Oocyte. Vergr. 28000mal

darstellt. Der künftige perivitelline Spalt ist hier bereits angedeutet. Dem Plasmalemm liegt eine Schicht meist radiär gestellter, sehr feiner Elemente auf (Abb. 4a).

Die Rindenhaut enthält vorwiegend tangential orientierte und unscharf begrenzte Elemente, die als Mucopolysaccharid-Micellen aufzufassen sind, wenn man zu ihrer Beurteilung histochemische Ergebnisse heranzieht. Die Verbindung zum Follikelepithel fehlt jetzt, so daß sich das Ei bei der Präparation von diesem löst und das Follikelepithel in unseren Schnitten nicht mehr anzutreffen ist.

b) Subkortikale Granula (Vakuolen) und Rindencytoplasma. Als subkortikale Granula oder Vakuolen (cortical granules) wurden bei verschiedenen Amphibien Gebilde beschrieben, die Mucopolysaccharide enthalten und die in ähnlicher Form auch unter anderem bei *Fischen* und bei *Seeigeln* gefunden wurden (*Amphibien:* Motomura 1952, Voss und Wartenberg 1955, Rosenbaum 1958, Kemp 1956a, b, Wartenberg 1956, 1959, Osanai 1958, 1960a, Katagiri 1959, Wartenberg und Gusek 1960a, b; *Fische:* Spek 1933, Konopacka 1935, 1937, K. Yamamoto 1951, T. Yamamoto 1956, Kanoh 1952, Kusa 1953, 1954, 1956, 1957a, b, 1958, Akate 1954, Osanai 1956, 1959, Arndt 1956, 1960a, b, Sterba 1957, T. S. Yamamoto 1957a, b; *Seeigel:* Hendee 1931 (nach Allen), Motomura 1941, Monné und Hårde 1951, McCulloch 1952, Afzelius 1956, Immers 1956, Runnström und Immers 1956, Y. Takashima 1960, Osanai 1960b, Balinski 1960; Zusammenfassungen: Allen 1958, Afzelius 1957).

Diese subkortikalen Granula entstehen sehr frühzeitig, noch vor dem Auftreten des ersten Pigmentes im Cytoplasma der Oocyte. Ihre chemische Beschaffenheit wechselt von Froschart zu Froschart. Die Mucopolysaccharide können neutral oder auch sauer reagieren (Wartenberg 1959). Da sie beim *Krallenfrosch, Xenopus laevis,* zuerst am späteren animalen Pol des Eies auftreten, wird dadurch schon zu diesem Zeitpunkt eine gewisse polare Differenzierung des Eies angelegt (Voss und Wartenberg 1955). Im ausgewachsenen Ovarialei liegen die subkortikalen Granula dicht unter der Eioberfläche. Am animalen Pol sind sie infolge der großen Pigmentdichte meist schlecht zu sehen, am vegetativen Pol dagegen recht gut.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Rindenregion junger *Froschoocyten* wurden von Kemp (1956a, b) und von Wartenberg und Gusek (1960a, b) diese subkortikalen Granula als wenig elektronendichte, sehr feingranulierte Körper im Cytoplasma gefunden.

Die Oocyten von *Rana temporaria* enthalten eine große Anzahl runder oder länglich ovaler Anschnitte, die meist zwischen 0,5 und 1,5 μ bemessen sind und welche teilweise sehr dicht gepackt und gegenseitig abgeplattet im Rindencytoplasma liegen (Abb. 1, 3, 4a).

Im voll ausgebildeten Ei liegen diese Granula direkt unter dem Plasmalemm. An einigen Stellen lagert eine sehr dünne Membran dem Plasmalemm fast ohne Zwischenraum an. Der Inhalt der Granula ist etwas elektronendichter, zeigt aber sonst die gleiche, sehr feingranuläre Struktur (Abb. 4a).

Am animalen Pol setzt sich das dichte Cytoplasma aus granulärem Material zusammen, dessen Partikel mit 120—180 Å noch im Bereich der Palade-Granula liegen. Außerdem enthält das Cytoplasma verschiedenartig gestaltete Bläschen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 0,2 μ (Abb. 3). Darüber hinaus ist diese Zone durch ihren Reichtum an Pigment und Lipoiden ausgezeichnet. Schließlich findet man besonders dichte Cytoplasmabezirke (Abb. 3, 4b). Diese Bezirke, die als freie Stellen im Pigmentmuster auffallen, sind bei höherer Auflösung als eine Ansammlung von feinen Bläschen zu erkennen. Die Bläschen haben einen mittleren Durchmesser von etwa 500 Å, können aber auch 100—750 Å messen. Zwischen ihnen liegen kompakte Granula, die mit etwa 100—180 Å in der Größe den Palade-Granula im übrigen Cytoplasma entsprechen. Die Plasmabezirke haben meist eine Ausdehnung von 1—1,5 μ. Man findet aber

auch kleinere Ansammlungen, vor allem unter dem Plasmalemm zwischen den subkortikalen Granula.

c) Die Feinstruktur der Pigmentgranula. Nachdem die Dotterbildung bereits begonnen hat, tritt das Pigment der Amphibienoocyte dicht unter der Rinde im Bereich des animalen Poles auf. Zusammenhänge zwischen den subkortikalen Granula und der Bildung der Pigmentgranula wurden nicht gefunden (Wartenberg und Gusek 1960). Die Pigmentgranula entstehen im endoplasmatischen Retikulum aus fast homogenen, mäßig dichten Korpuskeln, die teilweise eine zentrale Aufhellung enthalten und nach und nach an Dichte zunehmen. Als Pigmentgranula von *Triton alpestris* findet Dollander (1954, 1956) 0,3 μ große Granula, die sich aus einer Ansammlung von dichten Mikrogranula von 0,03 μ Durchmesser aufbauen. In dem Anschnitt eines Pigmentkornes zählte er etwa 20 solcher Mikrogranula. Das Pigmentgranulum soll von einer kaum sichtbaren Membran umgeben sein.

Die Pigmentgranula der Oocyte von *Rana temporaria* haben am animalen Pol einen Durchmesser zwischen 0,3 und 0,4 μ. Am vegetativen Pol sind die Granula wesentlich seltener und etwa um das Doppelte größer. Innerhalb eines an sich schon sehr dichten Internums kann man an dünn geschnittenen Stellen sehr dichte Mikrogranula in der Größe von 200—300 Å sehen (Abb. 4b). Eine feine Hülle ist nur an einigen Stellen, dort aber deutlich zu sehen (Abb. 4b, 6a).

2. Das unbefruchtete Ei

Wenn das Amphibienei in den Uterus gelangt, wird es in dem Ovidukt mit einer schleimigzähen Gallerthülle versehen. Außerdem soll nach Holtfreter (1943) zu diesem Zeitpunkt der surface coat angelegt werden. Elektronenmikroskopisch hat Dollander (1956) das unbefruchtete Ei von *Triton alpestris* und *T. helveticus* untersucht. Er findet am animalen Pol zahlreiche Mikrovilli und eine Plasmamembran. Das kortikale Plasma soll aus globulären Strukturen zusammengesetzt sein.

Das unbefruchtete Ei von *Rana temporaria*, das dem Uterus entnommen wurde und vor dem Fixieren nicht mit Wasser in Berührung gekommen ist, läßt keine Mikrovilli erkennen. Der ehemaligen Zona radiata, in deren einwärts gelegenen inneren Viertel noch Reste der Mikrovilli auszumachen sind, ist eine sehr breite Zone eines weniger dichten und vollständig homogenen Materials aufgelagert, in der unterschiedlich breite Schichten von dichterer Beschaffenheit parallel zur Eioberfläche verlaufen. Das Ei ist gegen die Eihüllen mit einem glatten Plasmalemm begrenzt, das an einigen Stellen kurze Ausstülpungen wie beim reifen Ovarialei zeigt. Unter dem Plasmalemm finden sich alle für die Oocyte bereits erwähnten Elemente: subkortikale Granula, Pigment und Lipoide sowie die dichten Plasmabezirke.

Zwischen den Dotterschollen sind große Bezirke mit einem wenig dichten, nur ganz fein granulierten Inhalt ausgespart. Nach den Ergebnissen der histochemischen Polysaccharid-Reaktionen enthalten diese Bezirke Glykogen. Es ist zu diesem Zeitpunkt in großen Mengen in der animalen Hälfte des Eies in Form von mehr oder weniger großen Granula abgelagert (Wartenberg, unveröffentl.).

3. Das befruchtete Ei

Nach Ancel und Vintemberger (1948) ist 15 min nach der Besamung die „Aktivierung" des Eies durchgeführt und die sog. Rindenreaktion eingeleitet. Eintritt des Spermiums und Beginn der Orientierungsdrehung des Eies in seinen Hüllen stehen kurz bevor. Die bis dahin gültige Vorstellung, die Orientierungsdrehung werde dadurch möglich, daß die perivitelline Flüssigkeit vom Ei abgegeben

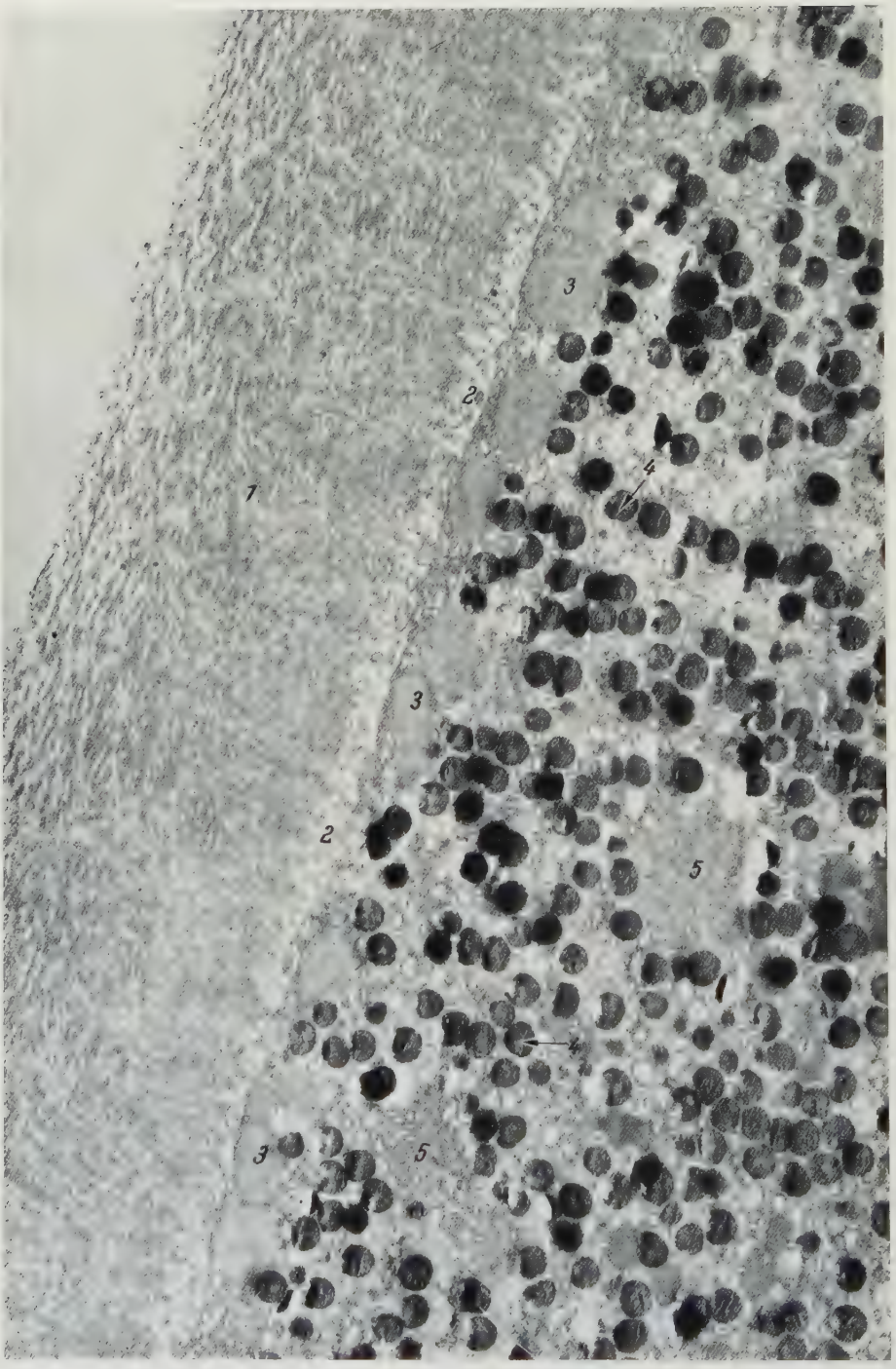


Abb. 3. Animaler Rindenbereich einer reifen Oocyte von *Rana temporaria*. *1* Zona radiata = Befruchtungsmembran; *2* zukünftiger perivitelliner Spalt mit kurzen Ausstülpungen des Eiplasmalemms; *3* subkortikale Polysaccharidvakuolen (cortical granules); *4* Pigmentgranula; *5* dichte Cytoplasmabezirke mit Bläschen. Vergr. 12000mal

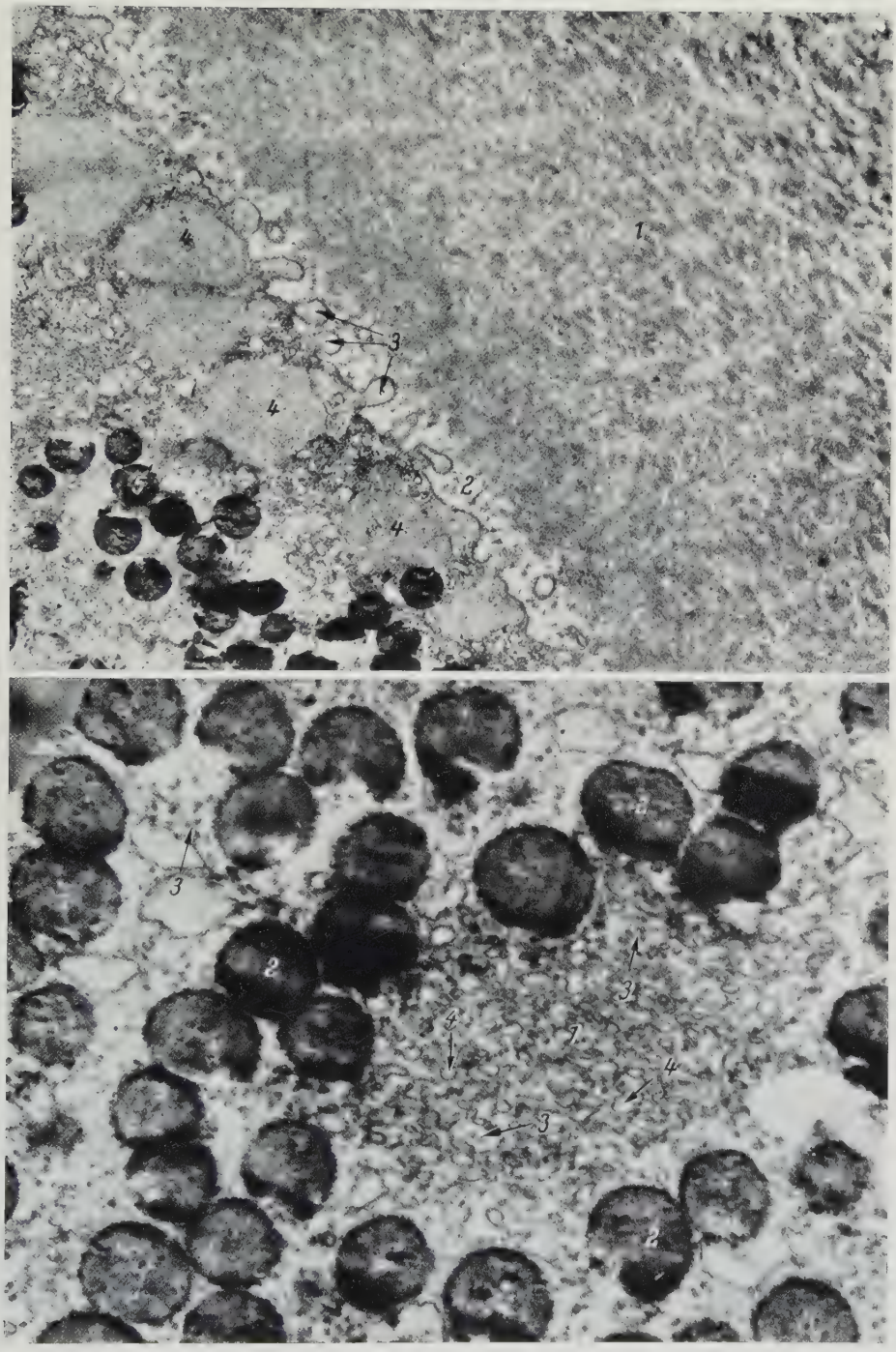


Abb. 4. a Oberflächenstruktur einer reifen Oocyte. *1* Zona radiata; *2* perivitelliner Spalt; *3* Plasmalemm-Ausstülpungen; *4* subkortikale Polysaccharidvakuolen; *5* Pigmentgranula. Vergr. 22000mal. b Dichter Cytoplasmabezirk (*1*) aus dem animalen Rindenbereich. *2* Pigmentgranula; *3* Palada-Granula; *4* feine Bläschen. Vergr. 42000mal

wird und daß durch diese Abgabe eine Verkleinerung des Eies erfolge, wurde von den Autoren bestritten. Sie konnten feststellen, daß eine perivitelline Flüssigkeit erst nach der Orientierungsdrehung in sichtbarer Menge auftritt und das Eivolumen keinesfalls abnimmt. Daraus schließen sie, die perivitelline Flüssigkeit müsse von außen eindringen und dabei eine dünne wasserlösliche Schicht auflösen.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt aber bereits zu diesem Zeitpunkt einen deutlichen perivitellinen Spalt (Abb. 5). Er enthält ein granuläres Material, das aus den subkortikalen Polysaccharidvakuolen stammt, denn diese sind bis auf geringe Reste verschwunden. Das Plasmalemm der Eizelle buchtet sich in Form kleiner Ausstülpungen in den Spalt vor, kann aber auch glatt abschließen. Das Dotterhäutchen (Befruchtungsmembran) läßt sich nur durch kaum sichtbare strukturelle Unterschiede von der anschließenden Gallerthülle unterscheiden. Gegen den perivitellinen Spalt hat es eine glatte Begrenzung.

Mit diesen Befunden lassen sich die Vorgänge um die Bildung des perivitellinen Spaltes und der Flüssigkeit in folgender Weise präzisieren: Infolge der Aktivierung der Eizelle wird der polysaccharidhaltige Inhalt der subkortikalen Vakuolen durch das Plasmalemm ausgeschleust, wodurch das Dotterhäutchen als Befruchtungsmembran von der Eioberfläche abgehoben wird, mit der es nur noch in einem sehr lockeren Zusammenhang steht. Der Inhalt des so entstandenen perivitellinen Spaltes hat vermutlich eine zähflüssige Konsistenz, die es gerade zuläßt, daß das Ei sich in den Hüllen langsam drehen kann. Der Wassereintritt erfolgt von außen wesentlich langsamer. Er führt zu einer zunehmenden Verflüssignng dieser schleimigen Substanz und zu einer Erweiterung des Spaltes bis zur Sichtbarkeit im Lichtmikroskop.

Eine andere auffällige Veränderung ist an den dichten Cytoplasmabezirken des animalen Rindenbereiches zu bemerken (Abb. 5, 6a, b). Sie haben an Umfang zugenommen, bestehen aber nach wie vor aus vesikulären Anteilen und der granulären Komponente. Die Bläschen sind verschieden groß, ihre Form ist sehr variabel. Die Durchmesser der Granula betragen 120—150 Å. Am vegetativen Pol findet man diese dichten Bezirke nicht. Das Rindencytoplasma des animalen Poles enthält zahlreiche Pigmentgranula, Lipoide, Mitochondrien und Dotterpartikel (Abb. 5). Über Unterschiede zwischen ventraler und dorsaler Hälfte können wir keine Angaben machen.

Die Abb. 7a zeigt den animalen Rindenbereich 30 min nach der Besamung; die Eihüllen wurden während der Fixierung entfernt. Die Eioberfläche ist von einer Schicht granulierten Materials bedeckt, dem noch nicht vollständig verflüssigten Inhalt des perivitellinen Spaltes. Das Plasmalemm verläuft leicht gewellt. Auffallend ist die starke Erweiterung der dichten Plasmabezirke, die jetzt z.T. ineinander übergehen und fast den ganzen Raum zwischen den übrigen Plasmabestandteilen einnehmen. Die Bläschen sind regelmäßiger geformt, größer und dickwandiger (Abb. 7b, 8). Man findet sie auch in den Bereichen des Cytoplasmas, die nicht direkt zu den dichten Bezirken gehören, vor allem unter dem Plasmalemm (Abb. 7a).

Außerdem enthält das Cytoplasma Vakuolen, in denen man sehr wenig granuläre Substanzen sieht (Abb. 7a). Ein Teil dieser Vakuolen liegt in der Nähe des

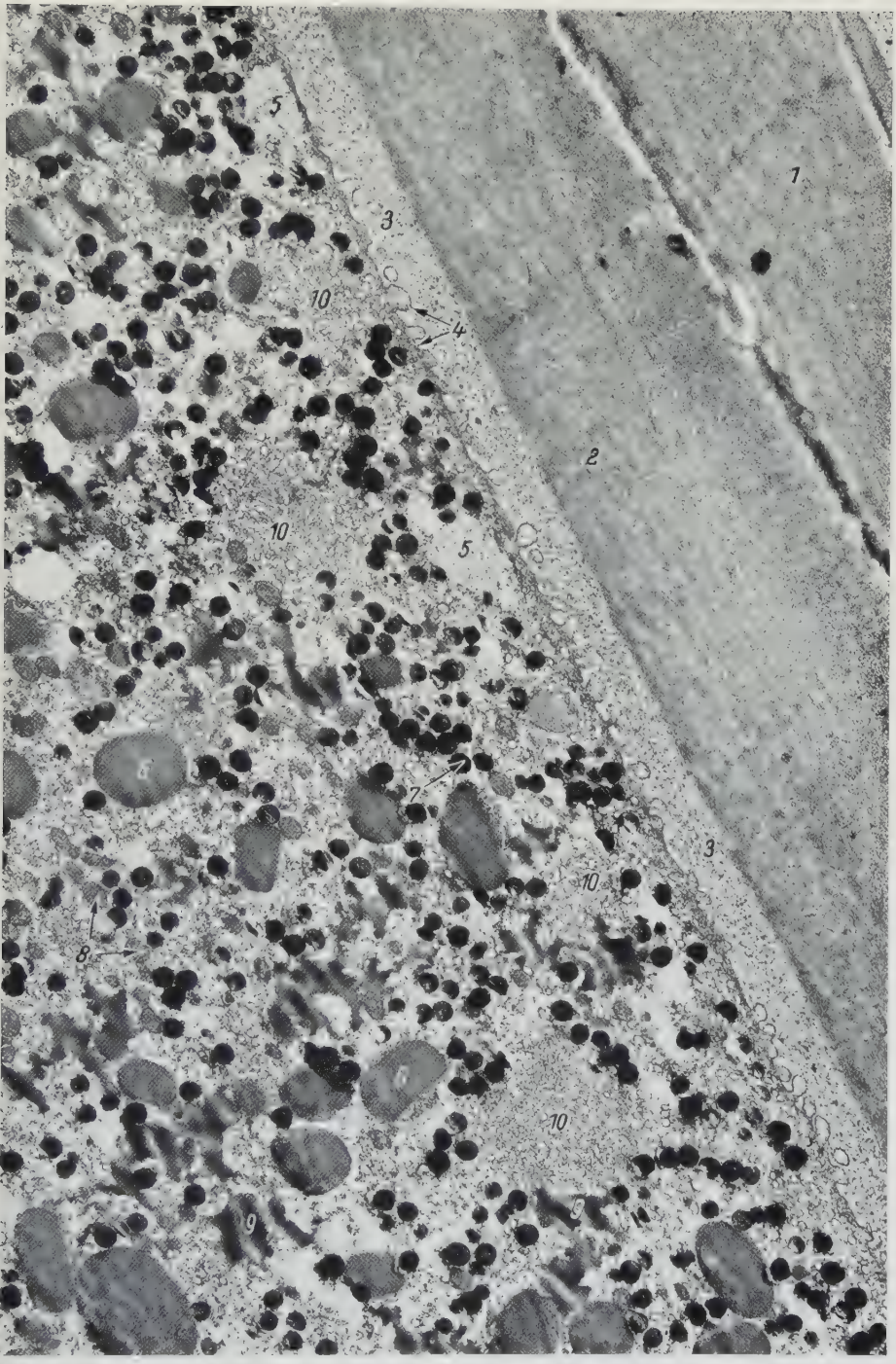


Abb. 5. Rindenbereich des animalen Poles eines Eies *(Rana temporaria)* 15 min nach der Besamung. *1* Gallerthülle; *2* Befruchtungsmembran; *3* perivitelliner Spalt mit granulärem Inhalt; *4* Plasmalemm der Eizelle mit kurzen Ausstülpungen; *5* Rest von subkortikaler Polysaccharidvakuole; *6* Dotterplättchen; *7* Pigmentgranulum; *8* Mitochondrien; *9* Lipoide; *10* dichte Cytoplasmabezirke mit Bläschen. Vergr. 7100mal

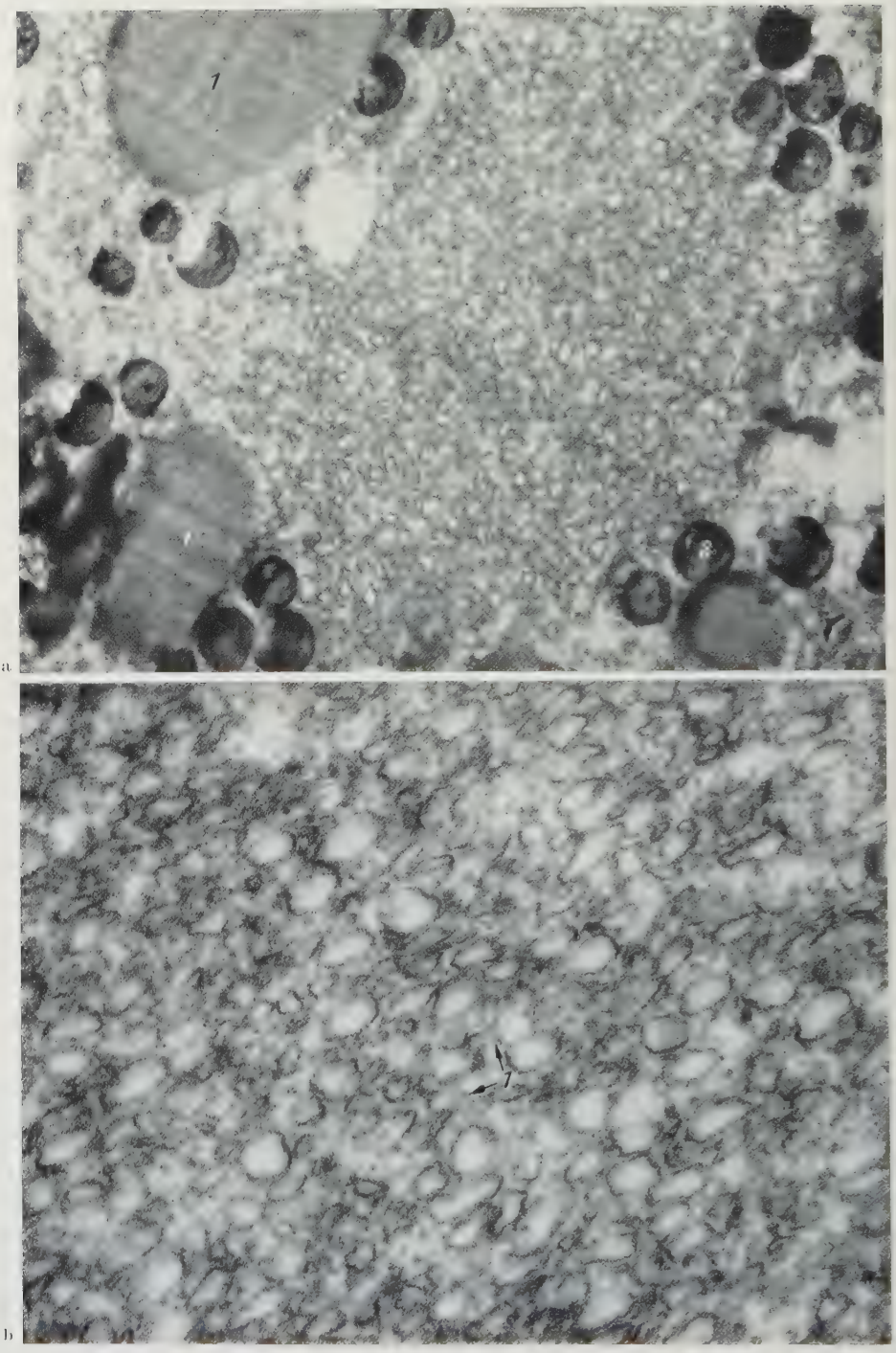


Abb. 6. a Dichter Cytoplasmabezirk aus dem animalen Rindenbereich 15 min nach der Besamung. *1* Dotterplättchen; *2* Pigmentgranulum. Vergr. 25000mal. b Dichter Cytoplasmabezirk bei hoher Auflösung. *1* Palade-Granula. Vergr. 80000mal

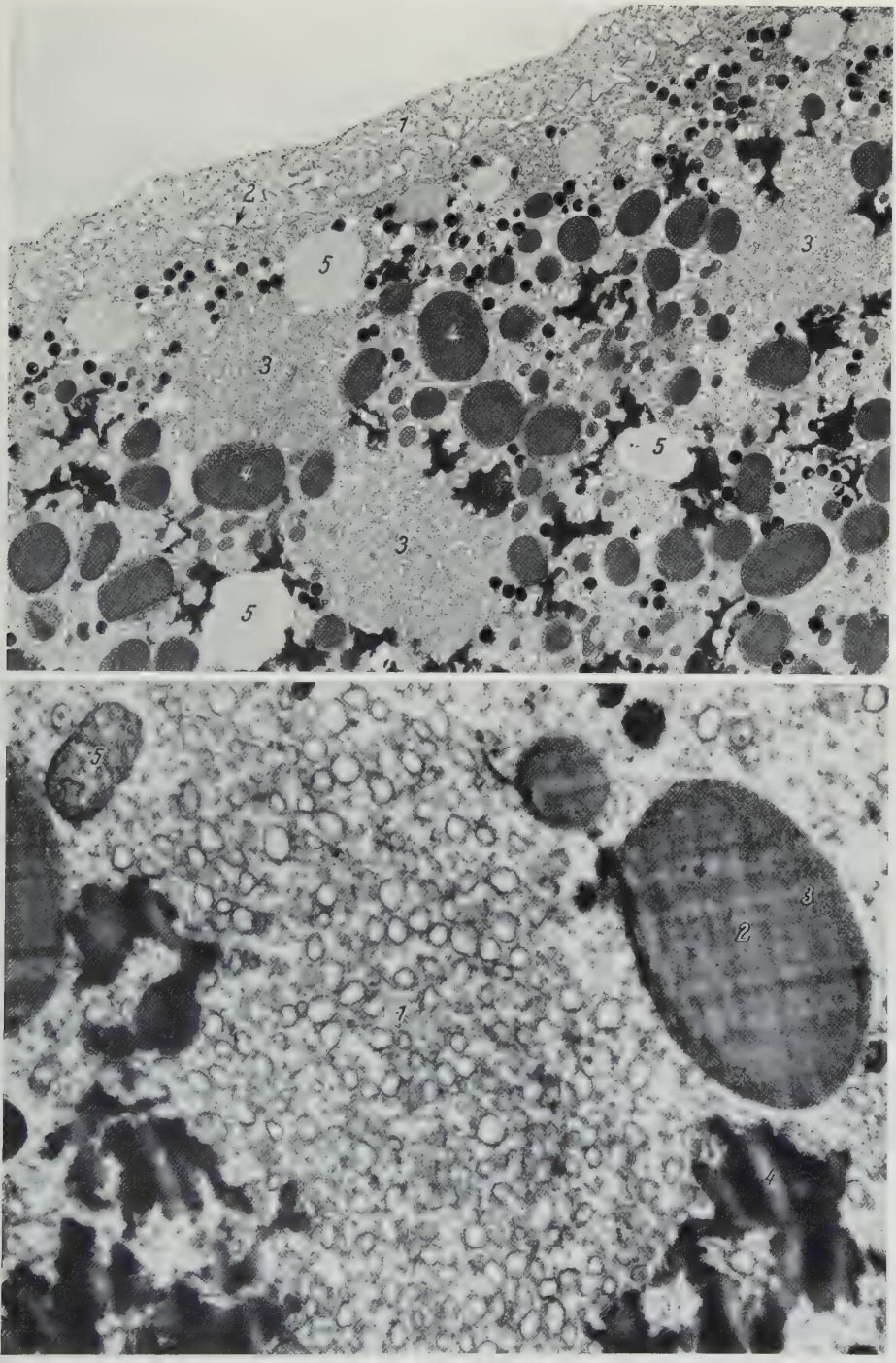


Abb. 7. a Rindenbereich eines Eis von *Rana temporaria* 30 min nach der Besamung (animaler Pol). *1* fixierter, noch nicht verflüssigter Inhalt des perivitellinen Spaltes; *2* Plasmalemm des Eies; *3* dichte Cytoplasmabezirke; *4* Dottergranula; *5* Glykogen. Vergr. 4400mal. b Dichter Cytoplasmabezirk (*1*) 30 min nach der Besamung; *2* Dotterplättchen mit granulierter Außenzone (*3*) und kristalloider Gitterstruktur im Zentrum; *4* Lipoide; *5* Mitochondrien. Vergr. 24000mal

Plasmalemms, andere sind im Cytoplasma verstreut. Es sind dies Glykogenvakuolen, wie man durch Vergleich mit Ergebnissen von histochemischen Untersuchungen feststellen kann (WARTENBERG, unveröffentlicht). Einige der Vakuolen

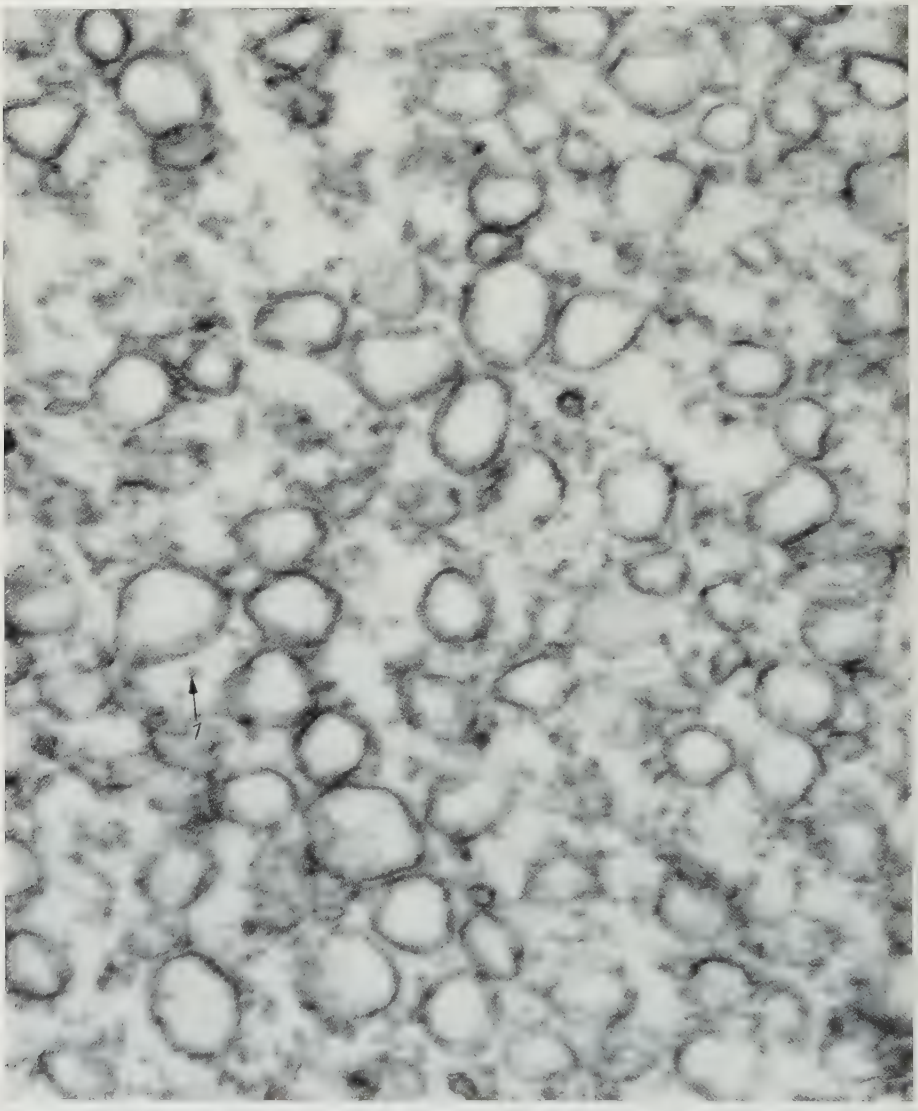


Abb. 8. Dichter Cytoplasmabezirk 30 min nach der Besamung bei hoher Auflösung. *1* Palade-Granulum. Vergr. 88300mal

direkt unter dem Plasmalemm enthalten saure Mucopolysaccharide, da sie neben einer positiven PAS-Reaktion auch eine positive Hale-Reaktion zeigen.

Die Dotterpartikel sind aus 2 Anteilen aufgebaut, nämlich einem sehr dichten Kern, der bei hoher Auflösung eine mehr oder weniger feine Gitterstruktur aufweist (Abb. 7b) und einer granulierten Randzone, die kalottenartig an zwei gegenüberliegenden Stellen im Bereich des kürzeren Durchmessers dem ovalen Querschnitt aufliegt. Das gesamte Dottergranulum ist von einer feinen Membran

umgeben (Abb. 7b). Einen kristallartigen Aufbau von Dotterplättchen von *Amphibien* haben auch Wischnitzer (1957), Karasaki und Komoda (1958) und Lanzavecchia (1960) beobachtet.

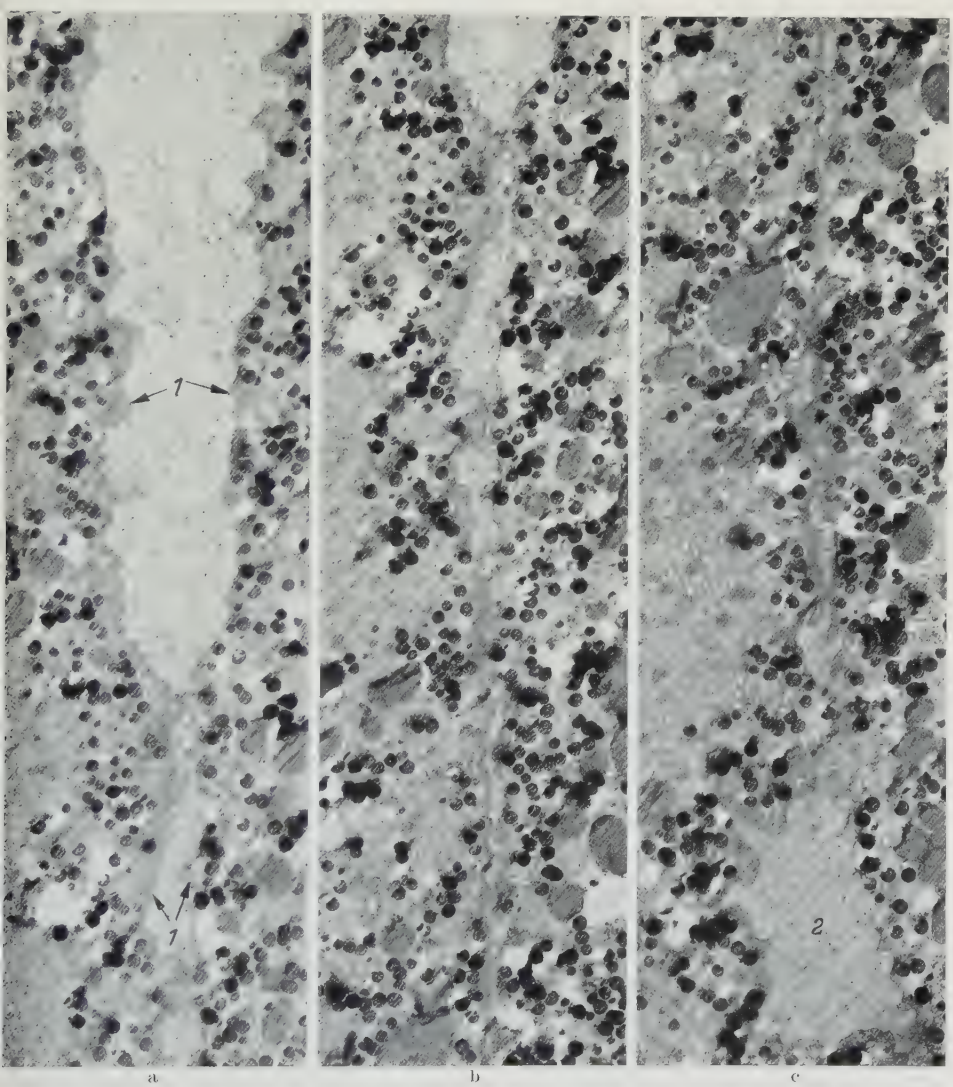


Abb. 9 a—c. Teilungsfurche eines Zweizellstadiums von *Rana temporaria*. Durchlaufende Plasmalemmata (*1*) der beiden Blastomeren. *2* Granulärer Inhalt des Interzellularspaltes. Vergr. 4900mal

4. Das gefurchte Ei: 1. Furche

Die Oberfläche der Blastomere im Zweizellstadium wird im Bereich der animalen Hälfte durch ein Plasmalemm gebildet, das keine Mikrovilli aufweist, sondern nur kurze flache Ausstülpungen. Von der beim ungefurchten Ei in Abb. 7a noch sichtbaren granulären und extrazellulär gelegenen Materialschicht ist nur ein geringer Rest verblieben (Abb. 10a).

Die Plasmalemmata der beiden Blastomeren begrenzen auch in der Tiefe der Furche die beiden Zellen und laufen kontinuierlich im Bereich der Kontaktflächen

weiter (Abb. 9a—c). Es läßt sich keine Schicht feststellen, die in der Tiefe der Furche von der einen Blastomere zur anderen überschlägt. Das Plasmalemm ist im Bereich der Furche und der Kontaktfläche mit einem sehr dichten, feingranulärem Material unterfüttert. Oder in anderer Weise ausgedrückt: Das schon relativ dichte Cytoplasma des animalen Rindenbereiches nimmt bis zum Plasmalemm noch an Dichte zu. Aus diesem Grund ist an dieser Stelle unter der Zellmembran eine mehr oder weniger breite Zone zu sehen.

Der Interzellularspalt zwischen den beiden Blastomeren ist unregelmäßig weit. Besonders in der Tiefe sind Ausstülpungen der beiden Blastomeren miteinander verzahnt, wodurch die Verhältnisse sehr unübersichtlich werden. Der Spalt ist mit dichtem, granulärem Material angefüllt (Abb. 9b, c).

Das Cytoplasma unter der Rindenschicht enthält außer dem schon erwähnten Grundplasma zahlreiche Pigmentgranula, einzelne Dotterpartikel und kleine runde Mitochondrien, ferner Lipoide und Polysaccharidvakuolen. Die Pigmentgranula sind in einer schmalen Zone beiderseits der Furche angereichert, eine aus der Lichtmikroskopie bereits bekannte Tatsache (Abb. 9).

An der freien Oberfläche des animalen Poles ist das Cytoplasma sehr dicht. Der dotterfreie Rindenbereich enthält außer vielen Pigmentgranula reichlich Bläschen, die in granuläres Material eingebettet sind. Die vesikuläre Komponente setzt sich aus feinen Anteilen von 30—50 mμ Durchmesser und gröberen Anteilen von 150—250 mμ Durchmesser zusammen. Diese gröberen Bläschen findet man auch in dem tiefer gelegenen dotterhaltigen Cytoplasma, das durch reichlich granuläres Material noch dichter als der dotterfreie Rindenbereich strukturiert ist. Eine schmale Zone unmittelbar unter dem Plasmalemm ist frei von den großen Bläschen (Abb. 10a).

Das Plasmalemm ist an der freien Oberfläche mit einem weniger dichten, granulären bzw. fädigen Material bedeckt (Abb. 10a). Es wird sich hierbei um eine Polysaccharidschicht handeln, ähnlich wie sie — allerdings in stärkerem Maße — von Wohlfarth-Bottermann (1959, 1960) bei verschiedenen Amoebenarten gefunden wurde.

Die granulierte Außenzone der Dotterplättchen ist lockerer. Man hat den Eindruck, daß die umgebende Membran bei einigen Plättchen unterbrochen ist und der granuläre Inhalt in die Umgebung abgegeben wird (Abb. 10a, b).

5. Ergebnisse über die entwicklungsbedingten Veränderungen des Rindenbereiches bei Triton alpestris

Die frühe ovarielle Entwicklung der Zona radiata beim *Molch* verläuft ähnlich wie die entsprechende Entwicklung beim Frosch. Wir sehen eine homogene Grundsubstanz, die extrazellulär liegt und in feinen Kanälchen Mikrovilli der Eioberfläche enthält (Abb. 11). Die innere Lage des 3schichtigen Follikelepithels sendet Cytoplasmafortsätze aus, die sich nach Passieren der Zona radiata tief in die Eioberfläche zwischen den Mikrovilli eingraben. Auch hier besteht kein syncytialer Zusammenhang. Die Zona radiata ist gegen die Follikelzelle scharf begrenzt. Zwischen ihr und dem Plasmalemm der Follikelzelle ist eine weniger dichte Substanzschicht eingeschoben.

Die Oberfläche der reifen Oocyte von *Triton* (Abb. 12) trägt im Gegensatz zu derjenigen von *Rana* noch Mikrovilli, die sich aber aus der Zona zurückgezogen

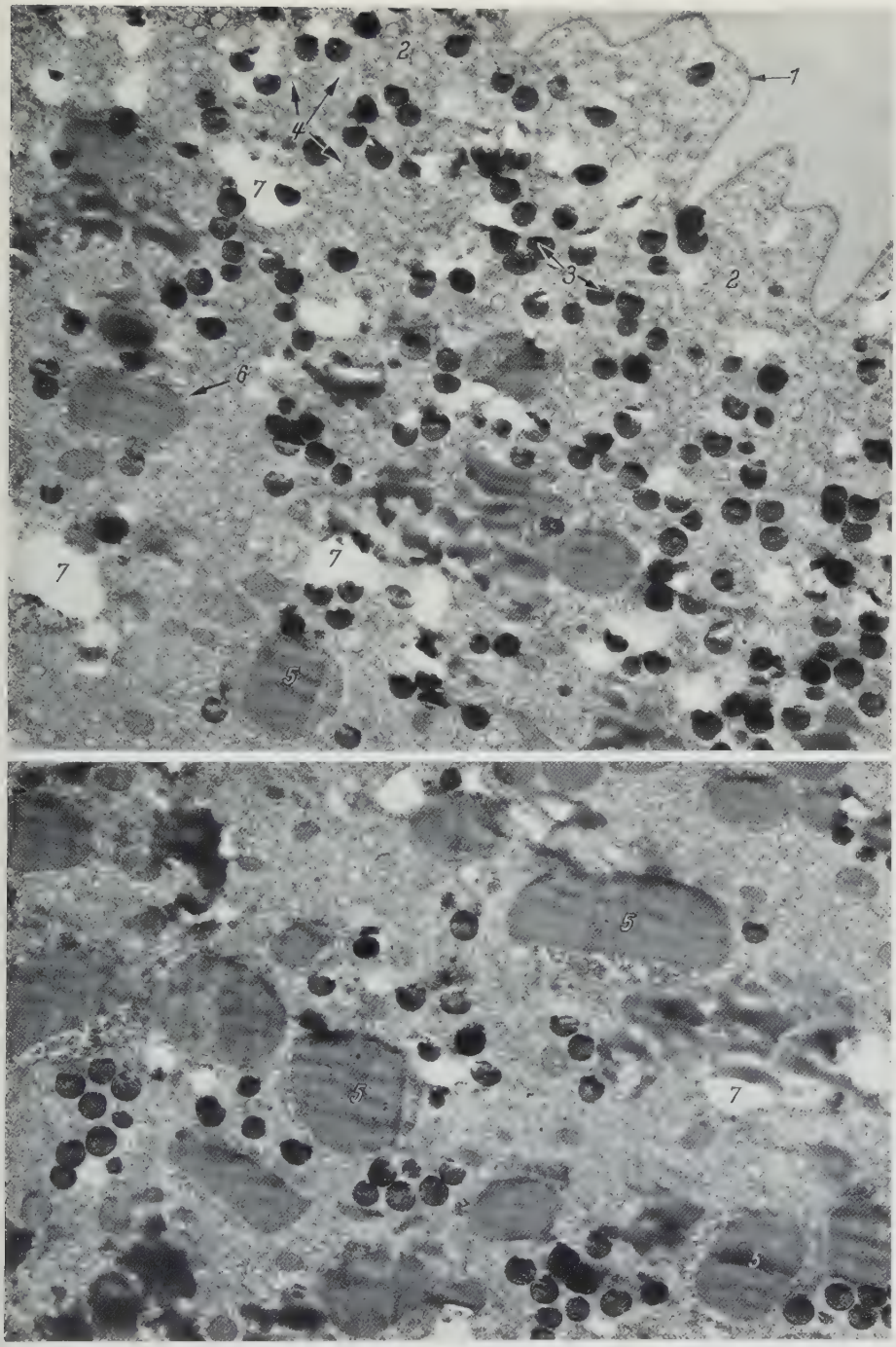


Abb. 10a u. b. Rindenbereich einer Blastomere im Zweizellstadium von *Rana temporaria*. *1* Plasmalemm; *2* Rindenzone mit vielen Pigmentgranula (*3*) und vesikulären (*4*) und granulären Strukturen; *5* Dottergranula mit granulierter Außenzone und Hüllmembran; *6* Hüllmembran unterbrochen; *7* beim Schneiden ausgebrochene Stellen. Vergr. 10000mal

haben und in einem breiten Spalt liegen. Dieser Spalt enthält außerdem granuläres Material. Follikelzellfortsätze sind nicht zu beobachten. Im dotterfreien

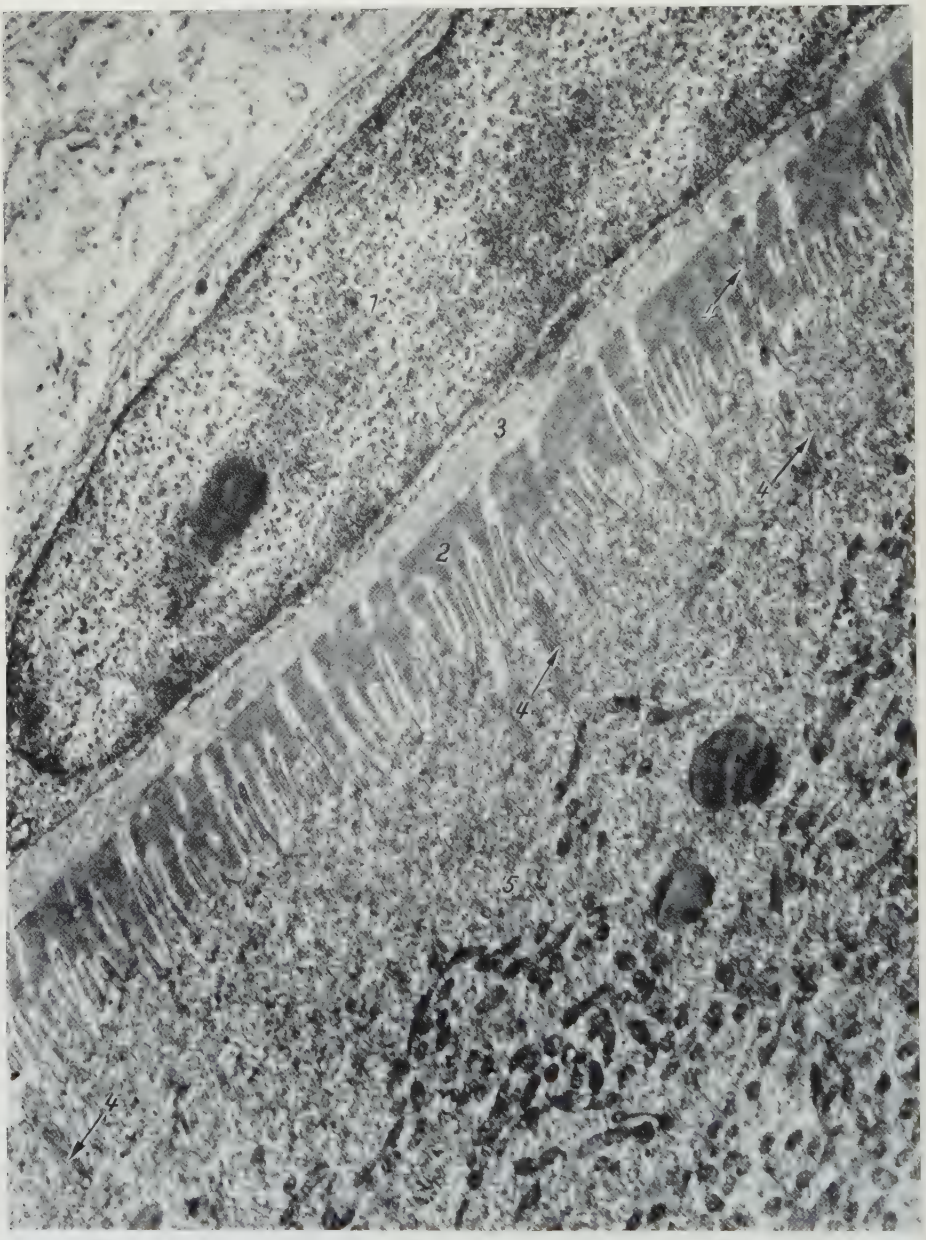


Abb. 11. Rindenbereich einer wachsenden Oocyte von *Triton alpestris*. *1* Kern der Follikelzelle; *2* Zona radiata mit Mikrovilli des Eies; *3* Schicht mit weniger dichtem Material zwischen Zona und Plasmalemm der Follikelzelle; *4* Cytoplasmafortsätze der Follikelzelle; *5* Rindencytoplasma des Eies mit Mitochondrien. Vergr. 13700mal

Rindenbezirk sieht man Mitochondrien, Pigmentgranula, Bläschen und granuläres Material und auch hier — jedoch wesentlich seltener — Bezirke mit dicht gelagerten Bläschen.

In Abb. 13 ist die Oberfläche eines Eies dargestellt, das dem Eileiter entnommen, für 15 min in Wasser gequollen wurde, dann enthüllt und fixiert wurde.

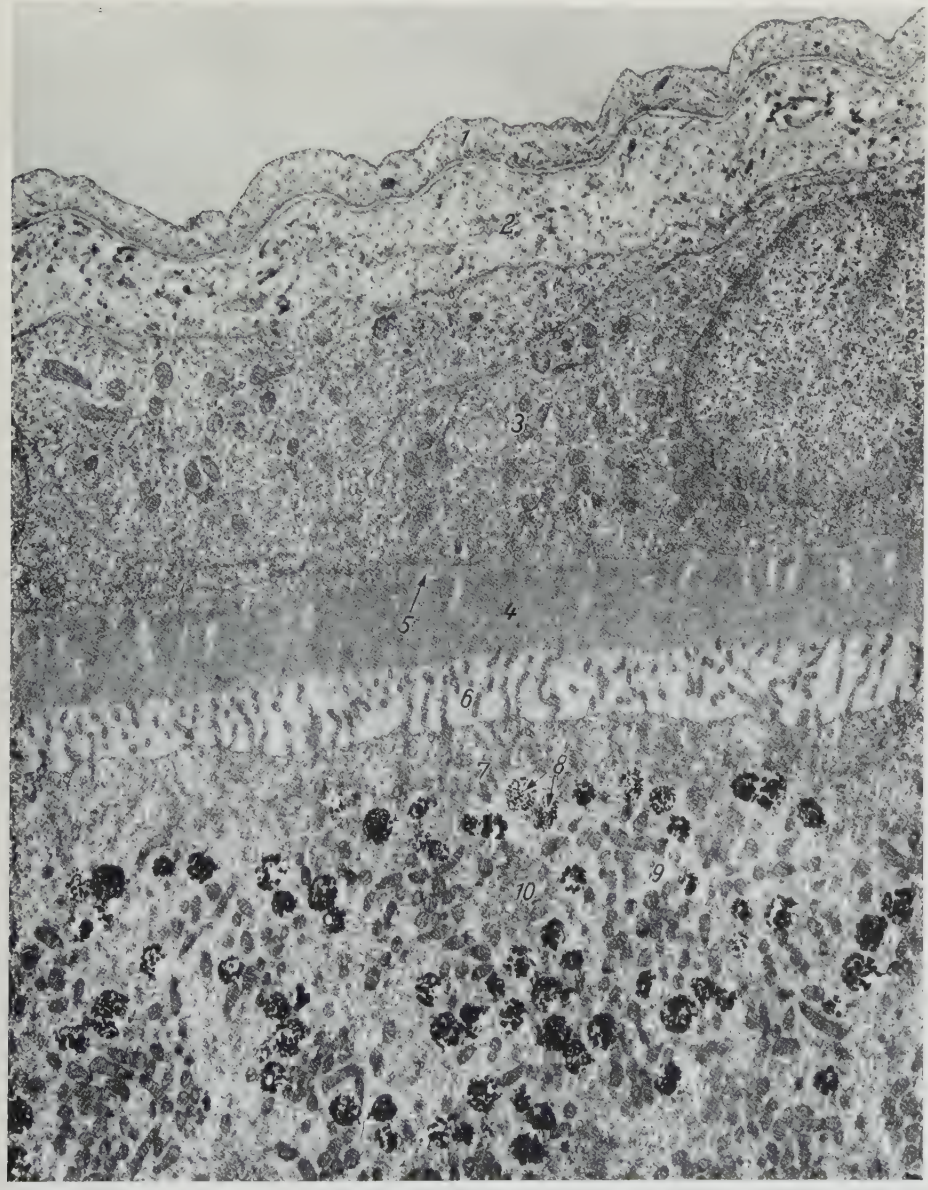


Abb. 12. Rindenbereich einer reifen Oocyte von *Triton alpestris*. *1* Peritoneum (äußere Schicht des Follikelepithels); *2* mittlere Bindegewebsschicht; *3* Follikelepithel; *4* Zona radiata = Befruchtungsmembran; *5* granuläre Schicht zwischen Zona und Follikelzelle; *6* zukünftiger perivitelliner Spalt mit Mikrovilli; *7* Rindencytoplasma; *8* Pigmentgranula; *9* Mitochondrien; *10* dichter Cytoplasmabezirk. Vergr. 9000mal

Die Mikrovilli sind noch vorhanden und von aufgelagertem granulärem Material bedeckt.

Im Morulastadium ist die äußere Oberfläche der Blastomeren glatt, sie zeigt keine Mikrovilli mehr (Abb. 14a, b, 15). Der perivitelline Spalt enthält eine

granuläre Schicht, die gegen die Befruchtungsmembran hin an Dichte zunimmt. Unter dem experimentellen Einfluß, wie ihn die Entfernung der Gallerthülle darstellt, dringt durch die Befruchtungsmembran Wasser in den perivitellinen Spalt ein und hebt sie samt der darunterliegenden Schicht von der Eioberfläche ab, vor allem im Bereich der Zellgrenzen.

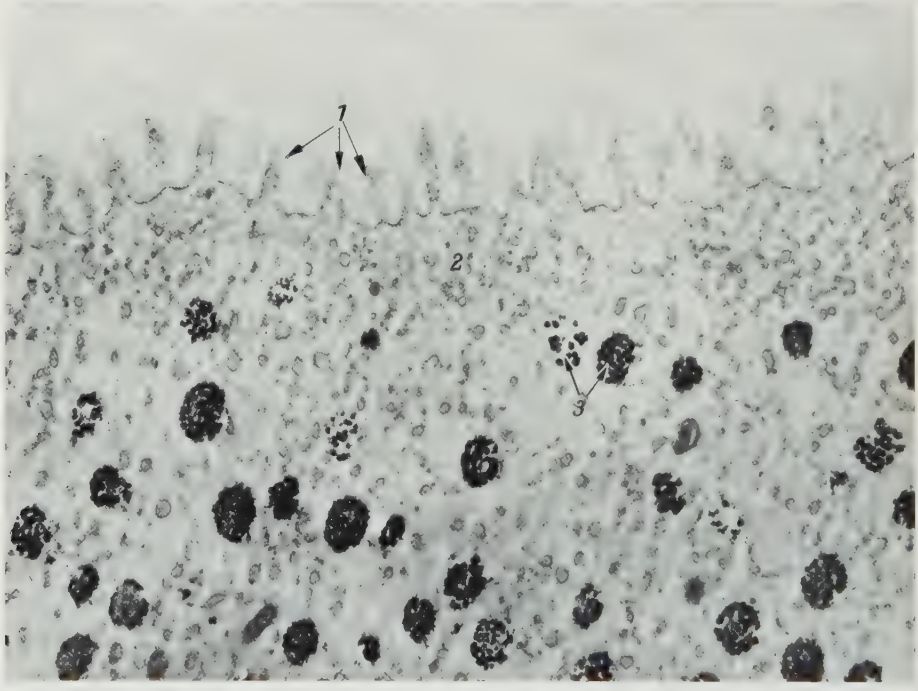


Abb. 13. Rindenbereich eines Eies von *Triton alpestris*, aus dem Ovidukt entnommen, Gallerthülle gequollen und vor der Fixation entfernt. *1* Mikrovilli in Auflösung begriffen; *2* Rindencytoplasma mit vesikulären Strukturen; *3* Pigmentgranula. Vergr. 13000mal

Besprechung der Befunde (Abb. 16)

In unseren bisherigen Untersuchungen fanden wir die Oberfläche der *Amphibien*oocyten von einer 3schichtigen Lage von Follikelzellen bedeckt [*Rana esculenta* (Wartenberg und Gusek 1960a, b), *Rana temporaria*, *Triton alpestris*, *Ambystoma*]. Nach Rugh (1951) stellt aber nur die innere Schicht das eigentliche Follikelepithel dar, während die beiden äußeren Schichten als Theca interna und Theca externa zu betrachten sind. Auffallend ist, daß sowohl das Follikelepithel als auch die „Theca externa" gegen die mittlere Schicht (Theca interna) mit je einer Basalmembran abgegrenzt sind und daß diese mittlere Lage nicht rein zellulärer Natur ist, sondern retikuläre Fasern enthält. Anhaltspunkte für das Vorhandensein von glatten Muskelzellen in dieser Schicht fanden wir in unseren Bildern bisher nicht (Rugh 1951). Die bindegewebige Natur der mittleren Zelllage läßt sich damit im elektronenmikroskopischen Bild eindeutig demonstrieren: Sie enthält auch die Gefäße, während die beiden anderen Schichten epithelialer Natur sind, wobei die äußere Schicht dem Peritonealepithel angehört.

Die Verbindung des Follikelepithels zum Ei und der damit verbundene Aufbau der Zona radiata[1] ist bei allen Amphibien gleichartig und kann als analoge Struktur (Zona pellucida) auch bei der Säugetieroocyte beobachtet werden (Yamada u. Mitarb. 1957, Sotelo und Porter 1959, Trujillo-Cenóz und Sotelo 1959, Odor 1960, Wartenberg und Stegner 1960).

Die *Zona-Grundsubstanz* wird bei der wachsenden Oocyte vom Ei und möglicherweise auch vom Follikelepithel gebildet und liegt *als extrazelluläre Struktur von geringer Differenzierung zwischen Eioberfläche und Follikelepithel.* Sie enthält zelluläre Anteile in diesem Stadium insofern, als *Mikrovilli des Eies und Fortsätze der Follikelzellen in sie eindringen.* Bei der reifen Oocyte haben sich diese Fortsätze zurückgezogen und zwischen den entsprechenden Zellen von *Anuren* und *Urodelen* macht sich ein gewisser Unterschied bemerkbar. Die *Froscheier* haben an der Oberfläche die *Mikrovilli bis auf kurze Ausstülpungen* des Plasmalemms *reduziert,* während die *reife Tritonoocyte noch Mikrovilli besitzt,* die aber nicht mehr in der Zona selbst gelegen sind, sondern in einem mit granulären Substanzen versehenen Spalt unterhalb der Zona, dem *perivitellinen Spalt. Außerdem enthält die Anurenoocyte im Rindenbereich große Polysaccharidvakuolen, während man solche bei den Urodelen nicht finden kann.*

Diese strukturellen Differenzen bedingen bei der Befruchtung einen unterschiedlichen Modus der Entstehung des definitiven perivitellinen Spaltes und seines Inhaltes. Die Befruchtungsmembran wird beim *Frosch* von der Eioberfläche dadurch abgehoben, daß der Inhalt der subkortikalen Polysaccharidvakuolen in den schon angedeuteten perivitellinen Spalt austritt und hier eine zähflüssige Schicht bildet, die aber in zunehmendem Maße durch Wassereintritt verflüssigt wird. Dadurch wird schon sehr bald die Orientierungsdrehung innerhalb der Befruchtungsmembran möglich (Katagiri 1959). Osanai (1958, 1960a) vermutet, daß diese Polysaccharidschicht mit dem surface coat Holtfreters identisch ist.

Bei dem *Triton*ei ist der perivitelline Spalt bereits im Oocytenstadium angelegt und enthält neben den Mikrovilli eine granuläre Substanz. Infolge der Befruchtung werden die Mikrovilli aufgelöst. Im weiteren Ablauf findet man die Eioberfläche durch ein Plasmalemm glatt abgeschlossen, den perivitellinen Spalt mit einer granulär-fädigen Substanz angefüllt, die gegen die Befruchtungsmembran

[1] Der Begriff Zona radiata wird synonym mit den Begriffen Dotterhaut bzw. -häutchen, Dottermembran, Eihaut, Rindenhaut, Kortex und z.T. Befruchtungsmembran verwendet. Eine lichtmikroskopisch sichtbare radiäre Streifung, wie man sie bei vielen Tierarten finden kann, gab Veranlassung zu diesem Namen. Der Begriff Zona pellucida wird meist auf das Säugerei beschränkt, dürfte aber nach dem heutigen Stand unseres Wissens eine der Zona radiata identische Struktur beinhalten. Für den Begriff Oolemm gilt das gleiche, obwohl wir diesen Begriff wegen seines irreführenden Charakters gerne aufgeben möchten. Voraussetzung für die Übereinstimmung der Begriffe Zona radiata und Zona pellucida muß sein, daß beide Gebilde als primäre Eihüllen von der Eizelle selbst produziert werden. Nun liegen jedoch Beobachtungen vor, die nicht nur auf eine Beteiligung des Eies, sondern auch des Follikelepithels hinweisen. So würde der Forderung nach Übereinstimmung der Begriffe z.T. entsprochen. Auf der anderen Seite würde sich der Begriff Chorion, der definitionsgemäß die vom Follikelepithel gebildete sekundäre Eihülle bezeichnet, mit den Begriffen Zona radiata und Zona pellucida teilweise decken, da ein nicht deutlich begrenzter Anteil der Zona bei Amphibien und Säugern von der Follikelzelle stammt.

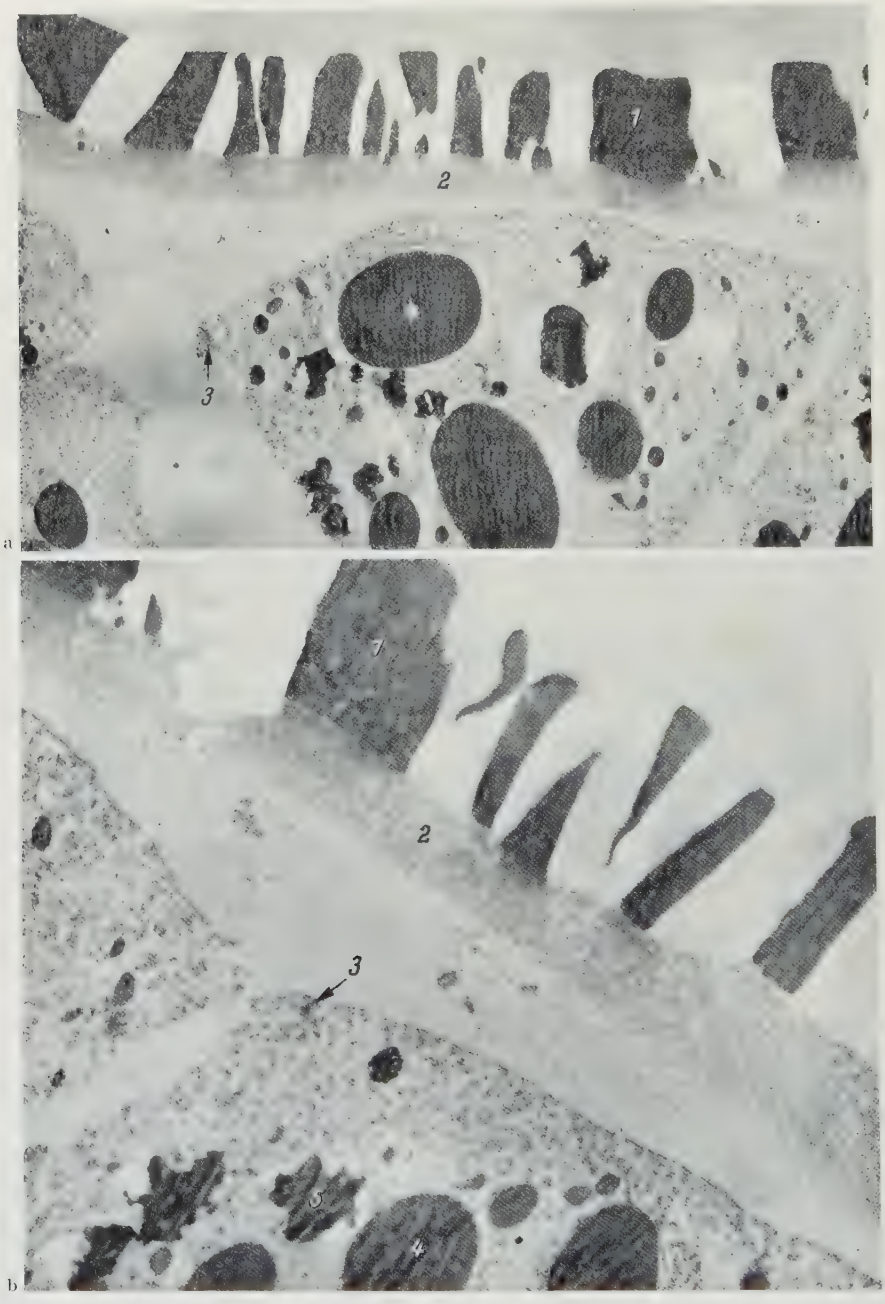


Abb. 14a u. b. Rindenbereich einer Morula von *Triton alpestris*. *1* Befruchtungsmembran, durch Fixierung und Einbettung frakturiert; *2* homogene Schicht im perivitellinen Spalt, im Bereich der Zellgrenzen durch Wassereintritt von der Keimoberfläche abgehoben; *3* Desmosomen (Zellverband in diesem Bereich künstlich zerstört); *4* Dotterplättchen; *5* Lipoide. Vergr. a 4700mal, b 10000mal

an Dichte etwas zunimmt. Dieser perivitelline Inhalt wird erst wesentlich später verflüssigt, so daß die Befruchtungsmembran vermittels dieser Schicht an der

Eioberfläche fest haftet und die Orientierungsdrehung des Eies, wie man annehmen muß, mitsamt der Befruchtungsmembran in der Gallerthülle vor sich geht.

Ein sehr enger funktioneller Zusammenhang besteht hier mit der Entwicklung des Holtfreterschen surface coat. Seine Entwicklung läßt sich gut an den

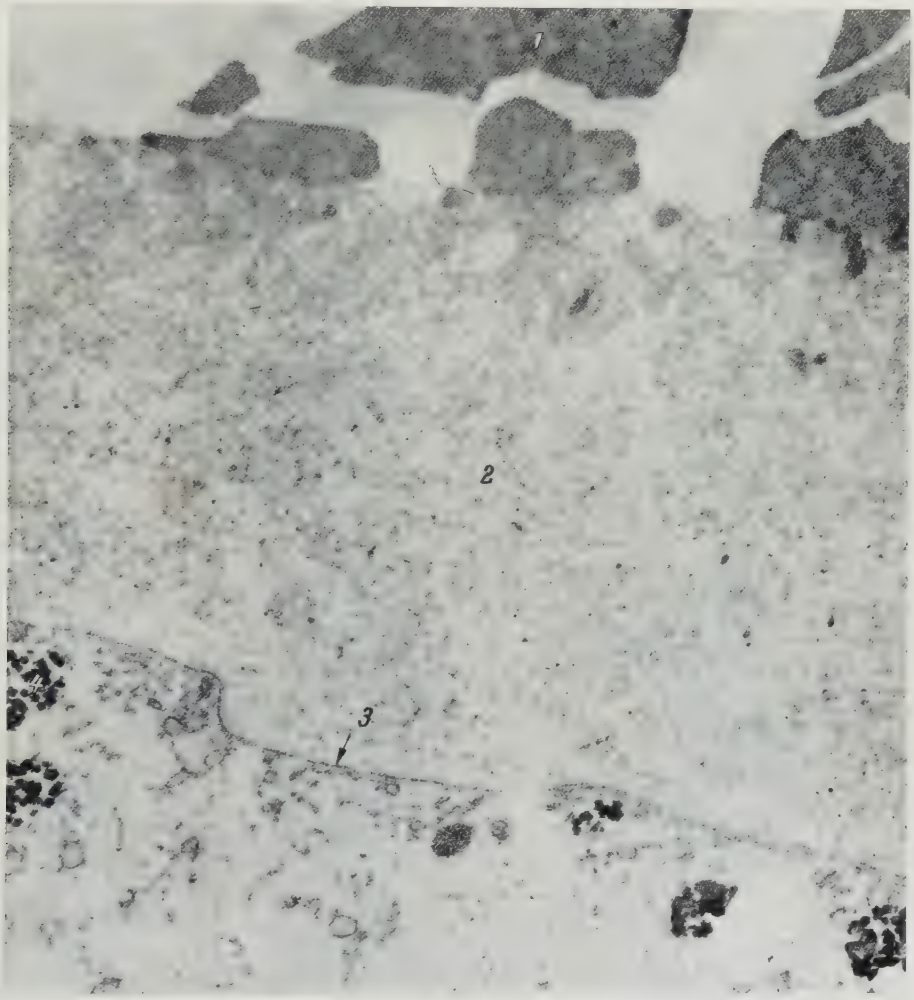


Abb. 15. Rindenbereich einer *Triton*morula. *1* Befruchtungsmembran; *2* perivitelliner Spalt mit granulärem Material angefüllt; *3* Plasmalemm einer Blastomere; *4* Pigmentgranula aus Mikrogranula zusammengesetzt. Vergr. 20 000mal

Froscheiern verfolgen. *Wir nehmen nämlich an, daß bestimmte vesikuläre und granuläre Komponenten des Rindencytoplasmas das morphologische Substrat des surface coat sind*, und daß diese in dichten Cytoplasmabezirken entstehen, die bereits in der reifen Oocyte zu beobachten sind. Diese Bezirke enthalten Bläschen und Palade-Granula; sie nehmen nach der Besamung des Eies an Umfang und Zahl zu, so daß sie schließlich einen großen Teil des Rindencytoplasmas einnehmen. Nach der Furchung des Eies liegen die Bläschen vor allem in der Zone dicht unter dem Plasmalemm, sind aber auch in dem übrigen sehr dicht strukturierten Rinden-

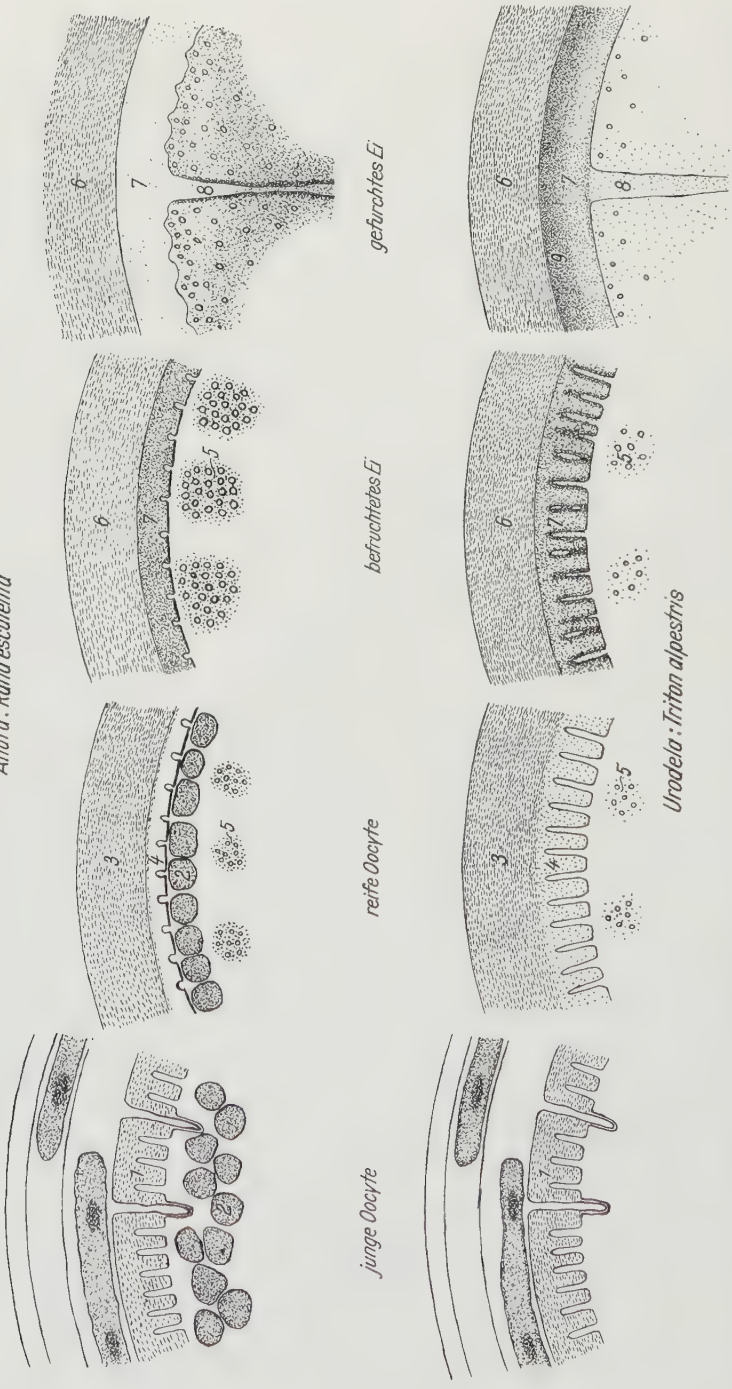


Abb. 16. Schematische Darstellung der Veränderungen im Rindenbereich der Eier von *Anuren* und *Urodelen* während der ovariellen Entwicklung und nach der Befruchtung. I Junge Oocyte. *1* Zona radiata mit Mikrovilli des Eies und Zellfortsätzen der Follikelzelle; *2* subkortikale Polysaccharidvakuolen (cortical granules). II reife Oocyte. *2* subkortikale Polysaccharidvakuolen; *3* Zona radiata = Befruchtungsmembran; *4* zukünftiger perivitelliner Spalt; *5* dichte Cytoplasmabezirke. III befruchtetes Ei. *5* dichte Cytoplasmabezirke; *6* definitive Befruchtungsmembran; *7* definitiver perivitelliner Spalt mit granulärem Inhalt. IV gefurchtes Ei. *6* Befruchtungsmembran; *7* perivitelliner Spalt; *8* Teilungsfurche; *9* dichte perivitelline Schicht im perivitellinen Spalt bei Urodelen

cytoplasma verstreut. *Da wir außerhalb der Zelle keine massive Schicht gefunden haben,* die in der Tiefe der Teilungsfurche von der Oberfläche einer Blastomere

zur anderen übertritt, möchten wir aus diesen Beobachtungen folgern, *daß der surface coat ein intrazelluläres Gebilde ist, dessen morphologisches Substrat in eben jenen Bläschen und Granula zu sehen ist.* Die intrazelluläre Lokalisation des surface coat, der von Holtfreter (1943) nur als ein funktionelles Gebilde definiert wurde (Wartenberg 1959), ist auch von Dollander (1960), Balinski (1960) und Yamada (1960) auf Grund ihrer Beobachtungen gefolgert worden. Eine von Balinski (1960) im Rindenbereich von Amphibien-Gastrula- und Neurulastadien beobachtete, aber nicht näher definierte Schicht, die er für die morphologische Grundlage des Rindenmantels anspricht, konnten wir bisher nicht finden.

Bei der zunehmenden Aufteilung der Eioberfläche im Rahmen der Morula- und Blastulaentwicklung muß an der Zellgrenze eine Haftstruktur entstehen, die die beiden mechanisch besonders widerstandsfähigen Rindenzonen verbindet. Nur durch die *Ausbildung von Desmosomen* ist im Zusammenhang mit dem verfestigten Rindencytoplasma ein *einheitlich wirksamer Oberflächenmantel denkbar.* Solche Desmosomen konnten von Dollander (1960) und Balinski (1960) beobachtet werden und wir konnten sie bei ersten orientierenden Untersuchungen an *Triton*keimen ebenfalls feststellen (Abb. 14a, b). Die zunehmende Dichte des Cytoplasmas bis zum Plasmalemm hin im Bereich der Teilungsfurche bei *Rana* (Abb. 9a—c) deuten wir dahingehend, daß hier die Entstehung von Desmosomen vorbereitet wird. Möglicherweise sind an der Desmosomenbildung auch die granulären, von uns für Mucopolysaccharidkomplexe gehaltenen Substanzen beteiligt, die im Spalt zwischen den beiden Plasmalemmata liegen.

Das Ei von *Triton alpestris* zeigt ein lockerer strukturiertes Rindencytoplasma. Man findet in der Oocyte und im Ei nach der Befruchtung nur sehr wenig dichte Bezirke mit Bläschen. Die Festigkeit der Rinde und der Zusammenhalt der Blastomeren wird bei *Triton* in den frühen Entwicklungsstadien vor der Gastrula durch die Befruchtungsmembran unterstützt, welche durch die zähflüssige, nur langsam sich auflösende Schicht des perivitellinen Spaltes mit der Eioberfläche in Verbindung steht.

Die stabilisierende Wirkung des Systems: perivitelline Schicht—Befruchtungsmembran ließ sich durch einen sehr einfachen Versuch demonstrieren. Entwicklungsstadien von *Triton* (ungefurchte Keime bis zur Neurula) wurden für 2 Std nach Entfernung der Gallerthülle in eine Holtfreter-Lösung eingelegt, die pro ml 15 IE Hyaluronidase (Luronase „Bayer") gelöst enthielt. In der Tabelle sind die Versuchsergebnisse zusammengestellt. Durch die Fermentwirkung wird die perivitelline Schicht aufgelöst und die Blastomeren der frühen Furchungsstadien verlieren vollständig ihren Zusammenhalt, so daß eine koordinierte Weiterentwicklung nicht oder nur bedingt möglich ist. Es muß daher angenommen werden, daß unter der Fermenteinwirkung eine Ausbildung von Desmosomen unterbunden wird. Dies läßt sich gut an den Blastomeren einer Morula oder Blastula beobachten, die sich unter Fermentbehandlung teilen. Es kommt an der neuen Zellgrenze zu einem Auseinanderweichen des Pigmentes, das aber nicht auf eine intrazelluläre Pigmentverschiebung zurückzuführen ist, sondern mit einem ungenügenden Zusammenhalt der Tochterblastomeren erklärt werden muß. Vollständig ausgebildete Desmosomen können durch das Ferment nicht mehr beeinflußt werden. Aus diesem Grund hat das Ferment auf die Blastula und weitere Stadien keine Wirkung mehr, da bei einem einmal vorhandenen „Rahmennetz"

Tabelle. *Triton alpestris. Behandlung mit Hyaluronidase 15 IE pro ml Holtfreter-Lösung*

Stadium der Keime bei Beginn der Behandlung	Stadium der Keime nach 2 Std Behandlung	Ergebnis der Behandlung	Kontrolle in Holtfreter-Lösung
1. Befruchtetes Ei vor Teilung	2-Zellstadium erreicht	Zusammenhalt der Blastomeren gelöst. Keine weitere Entwicklung	Normale Entwicklung
2. 2-Zellstadium	Morula	Zusammenhalt der Blastomeren gelöst. Keine weitere Entwicklung	Normale Entwicklung
3. Morula-Blastula	Blastula	Zusammenhalt der Blastomeren an der Oberfläche z. T. etwas gelöst: Scheinbare Verschiebung des Pigmentes. Wundheilungstendenz gut erhalten. Normale Entwicklung	Normale Entwicklung
4. Gastrula	Gastrula	Keine Veränderungen. Normale Entwicklung	Normale Entwicklung
5. Neurula	Neurula	Keine Veränderungen. Normale Entwicklung	Normale Entwicklung

von Desmosomen ein ausreichender Zusammenhalt der Keimoberfläche gegeben ist.

Man kann zusammenfassend sagen, daß die beiden Komponenten, die für die Festigkeit und den Zusammenhalt des Keimes in der Frühentwicklung verantwortlich sind, in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zueinander stehen: *Mit zunehmender Stabilisierung des Kortexbereiches, d.h. mit fortschreitender Ausbildung des surface coat nimmt die unterstützende Wirkung der Befruchtungsmembran durch die Verflüssigung des perivitellinen Inhaltes ab.* Bei den *Anuren* erfolgt dieser Wechsel bereits vor der Furchung, so daß eine Orientierungsdrehung des Eies innerhalb der Befruchtungsmembran möglich ist; bei den *Urodelen* wird diese Sicherungsmaßnahme wesentlich langsamer aufgegeben. Damit soll aber nicht gesagt werden, daß der *Triton*keim sich nicht auch ohne diesen Schutz entwickeln könnte. Offensichtlich reicht die Festigkeit des Rindenbereiches unter solchen experimentellen Bedingungen für einen normalen Ablauf der Entwicklung aus, wovon man sich bei jedem entwicklungsphysiologischen Experiment mit *Triton*eiern überzeugen kann.

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Rindenbereiches der wachsenden und reifen Oocyte, des unbefruchteten Eies und der Veränderungen dieser äußeren Zone durch die Befruchtung *(Rana temporaria)* ergaben folgendes:

1. Das Follikelepithel besteht aus 3 Schichten. Die äußere Schicht gehört zu den Peritonealzellen, die mittlere Lage ist bindegewebiger Natur, während die innere Schicht das eigentliche Follikelepithel darstellt. Die Bindegewebsschicht wird von 2 Basalmembranen begrenzt; sie enthält Gitterfasern und Gefäße.

2. Das Follikelepithel steht mit der Eioberfläche durch dünne Cytoplasmafortsätze in Verbindung. Diese durchsetzen die extrazelluläre, polysaccharidhaltige Grundsubstanz der Zona radiata und berühren mit ihren Enden das Plasmalemm der Eizelle oder graben sich in deren Oberfläche ein.

3. Es besteht kein kontinuierlicher syncytialer Zusammenhang zwischen dem Cytoplasma der Follikelepithelzellen und der Eizelle.

4. Die Zona radiata enthält außerdem Mikrovilli, die sich bei der heranwachsenden Oocyte in die innere Hälfte der Zona erstrecken.

5. Die Zona radiata der reifen Oocyte hat keine Mikrovilli oder Cytoplasmafortsätze. Zwischen Eioberfläche und Zona ist der künftige perivitelline Spalt bereits angedeutet.

6. Im Rindenbereich der wachsenden und reifen Oocyte findet man Rindengranula, deren polysaccharidhaltiger Inhalt nach der Besamung in den perivitellinen Spalt abgegeben wird. Diese anfänglich zähflüssige Substanz verflüssigt sich zunehmend durch Wassereintritt, wodurch die Orientierungsdrehung des Eies möglich wird.

7. Neben Pigmentgranula, Mitochondrien und Lipoidtröpfchen enthält das kortikale Cytoplasma des animalen Poles dichte Cytoplasmabezirke, die aus einer Ansammlung von feinen Bläschen und Palade-Material bestehen. Nach der Besamung nehmen die Bezirke an Umfang und Anzahl beträchtlich zu. Diese dichten Bezirke halten wir für Strukturen, die mit der Bildung des Holtfreterschen „surface coat" in engem Zusammenhang stehen und Beziehungen zu dem Substrat dieser Oberflächenstruktur haben, möglicherweise im Sinne von Bildungszentren.

8. Im Furchungsstadium wird bei den Anuren keine extrazelluläre Struktur gefunden.

9. Wir nehmen an, daß der „surface coat" ein intrazelluläres Gebilde ist, das im Rindenbereich des Eies lokalisiert ist.

10. Die Oocyten von Urodelen *(Triton alpestris)* haben keine kortikalen Polysaccharidgranula. Der Polysaccharid-Inhalt des perivitellinen Spaltes entsteht hier vorwiegend durch Auflösung der Mikrovillischicht, die bis zur Besamung erhalten bleibt.

11. Nach der Besamung bilden das Dotterhäutchen, der zähflüssige Inhalt des perivitellinen Spaltes und die Eirinde in wechselseitiger Unterstützung eine Einheit im Hinblick auf die Rindenstabilität des sich entwickelnden Keimes. Die Verfestigung des Rindenbereiches und die Ausbildung von Desmosomen geht parallel mit einer zunehmenden Verflüssigung des perivitellinen Inhaltes.

12. Die funktionelle Bedeutung dieser extrazellulären perivitellinen Schicht wurde durch Behandlung von Tritonkeimen verschiedener Entwicklungsstufen mit Hyaluronidase demonstriert. Von der Furchung bis zur frühen Morula verlieren die Blastomeren ihren Zusammenhalt.

Literatur

Afzelius, B. A.: The ultrastructure of the cortical granules and their products in the sea urchin egg as studied with the electron microscope. Exp. Cell Res. **10**, 257—285 (1956).

Afzelius, B.A.: Electron microscopy on sea urchin gametes. Uppsala 1957.

Aketa, K.: The chemical nature and the origin of the cortical alveoli in the egg of the medaka, Oryzias latipes. Embryologia **2**, 63—66 (1954).

Allen, R. D.: The initiation of development. Symposium on the chemical basis of development. Baltimore: Johns Hopkins Press 1958.

Ancel, P., et P. Vitemberger: Recherches sur le déterminism de la symétrie bilatérale dans l'oeuf des Amphibiens. Bull. Biol. France et Belg. Suppl. **31**, 1—182 (1948).

Arndt, E. A.: Histologische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese und bipolare Differenzierung von Süßwasser-Teleosteern. Protoplasma **47**, 1—36 (1956).

— Über die Rindenvakuolen der Teleosteeroocyten. Z. Zellforsch. **51**, 209—224 (1960).

— Untersuchungen über die Eihüllen von Cypriniden. Z. Zellforsch. **52**, 315—327 (1960).

Balinski, B. I.: Vortrag. Symposium des Institut International d'Embryologie in Pallanza 1960.

Chaudhry, H. S.: The origin and structure of the zona pellucida in the ovarian eggs of teleosts. Z. Zellforsch. **43**, 478—485 (1956).

Dollander, A.: La structure du cortex de l'oeuf de Triton observée sur coupes fines et ultrafines au microscope ordinaire, et au microscope électronique. C. R. Soc. Biol. (Paris) **148**, 152 (1954).

— Ultrastructure de la région corticale de l'ovocyte et de l'oeuf fécondé symétrisé chez le Triton. C. R. Soc. Biol. (Paris) **150**, 998 (1956).

— Rapport: Le cortex de l'oeuf d'amphibien. Première Réunion Européenne d'Anatomie, Strasbourg 1960.

Hendee, E. C.: Publ. Carneg. Inst. **27**, 101 (1931). Zit. nach Allen.

Holtfreter, J.: Properties and functions of the surface coat in amphibians. J. exp. Zool. **93**, 251—323 (1943).

— A study of the mechanics of gastrulation. J. exp. Zool. **94**, 261—318 (1943).

Immers, J.: Changes in acid mucopolysaccharides attending the fertilization and development of the sea urchin. Ark. Zool. **9**, 367—375 (1956).

Kanoh, Y.: Über den japanischen Hering (Clupea pallasi Cuvier et Valenc.). II. Veränderungen im Ei bei der Befruchtung oder Aktivierung. Cytologia (Tokyo) **18**, 67—79 (1952).

Karasaki, S., and T. Komoda: Electron micrographs of a crystalline lattice structure in yolk platelets of the amphibian embryo. Nature (Lond.) **181**, 407 (1958).

Katagiri, C.: Cortical change at fertilization in the egg of the grass frog, Rana temporaria. J. Fac. Sci. Hokkaido **14**, 166—174 (1959).

Kemp, N. E.: Differentiation of the cortical cytoplasm and inclusions in oocytes of the frog. J. biophys. biochem. Cytol. Suppl. **2**, 187 (1956).

— Electron microscopy of growing oocytes of Rana pipiens. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 281—292 (1956).

Konopacka, B.: Recherches histochimiques sur le développement des poissons. I. La vitellogénèse chez le Goujon (Gobia fluv.) et la carpe (Cyprinus carpio). Bull. int. Acad. pol., Cl. math.-nat., Sér. B **2**, 1—23 (1935).

— Recherches histochimiques sur le développement des poissons. II. La vitellogénèse chez certains téléosteens de mer (Gobius paganellus, Smaris alcedo, Crenilabrus pavo, Atherina Boyeri et A. hepsetus). Pubbl. Staz. zool. Napoli **16**, 327—362 (1937).

Kusa, M.: On some properties of the cortical alveoli in the egg of the stickleback. Annot. Zool. Jap. **26**, 138—144 (1953).

— The cortical alveoli of salmon egg. Annot. Zool. Jap. **27**, 1—6 (1954).

— Studies on cortical alveoli in some teleostean eggs. Embryologia (Nagoya) **3**, 105—129 (1956).

— Osmotic behavior of the isolated cortical alveoli of stickleback eggs. Annot. Zool. Jap. **30**, 67—70 (1957).

— Occurrence of a neutral mucopolysaccharide in the cortical alveoli of lamprey eggs. J. Fac. Sci. Hokkaido **13**, 455—457 (1957).

— Explosion of isolated cortical alveoli of the stickleback egg. Annot. Zool. Jap. **31**, 212—215 (1958).

Lanzavecchia, G.: Vortrag. Symposium des Institut International d'Embryologie in Pallanza 1960.

McCulloch, D.: Note on the origin of the cortical granules in Arbacia punctulata eggs. Exp. Cell Res. **3**, 605—607 (1952).

Monné, L., and S. Hårde: On the cortical granules of the sea urchin egg. Ark. Zool. **1**, 487—498 (1951).

Motomura, I.: Materials of the fertilization membrane in the eggs of echinoderms. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. **16**, 345—364 (1941).
— Cortical granules in the egg of the frog. Annot. Zool. Jap. **25**, 238—241 (1952).
Odor, D. L.: Electron microscopic studies on ovarian oocytes and unfertilized tubal ova in the rat. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 567—574 (1960).
Osanai, K.: On the ovarian eggs of the loach, Lefua echigonia, with special reference to the formation of the cortical alveoli. Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV **22**, 181—188 (1956).
— Cortical change at fertilization in the toad eggs. Bull. Marine Biol. Stat. Asamushi **9**, 47—48 (1958).
— Polysaccharide reactions in the oocytes of the loach, Lefua echigonia. Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV **25**, 37—43 (1959).
— On the cortical granules of the toad egg. Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV **26**, 69—75 (1960).
— Development of the sea urchin egg with the inhibited breakdown of the cortical granules. Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV **26**, 77—87 (1960).
Rhodin, J.: Correlation of ultrastructural organization and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Karolinska Institutet, Stockholm, Aktiebolaget Godvil, 1954.
Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München: Leibniz 1948.
Rosenbaum, R. M.: Histochemical observations on the cortical region of the oocytes of Rana pipiens. Quart. J. micr. Sci. **99**, 159—169 (1958).
Rugh, R.: The frog. Its reproduction and development. Philadelphia: The Blakiston Comp. 1951.
Runnström, J., and J. Immers: The role of mucopolysaccharides in the fertilization of the sea urchin egg. Exp. Cell Res. **10**, 354—363 (1956).
Sotelo, J. R., and K. R. Porter: An electron microscope study of the rat ovum. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 327—342 (1959).
Spek, J.: Die bipolare Differenzierung des Protoplasmas des Teleosteer-Eies und ihre Entstehung. Protoplasma **18**, 497—545 (1933).
Sterba, G.: Zur Differenzierung der Eihüllen bei Knochenfischen. Z. Zellforsch. **46**, 717—728 (1957).
Takashima, Y.: Studies on the ultrastructure of the cortical granules in sea urchin eggs. Tokushima J. exp. Med. **6**, 341—349 (1960).
Trujillo-Cenóz, O., and J. R. Sotelo: Relationships of the ovular surface with follicle cells and origin of the zona pellucida in rabbit oocytes. J. biophys. biochem. Cytol. **5**, 347—350 (1959).
Voss, H., u. H. Wartenberg: Der topochemische Nachweis einer frühzeitigen polaren Differenzierung des Amphibieneies mit Hilfe der PAS-Reaktion. Wiss. Z. Univ. Jena **4**, 413—417 (1955).
Wartenberg, H.: Topochemische Untersuchungen an den Ovarialeiern von Xenopus laevis und Rana fusca. Acta histochem. (Jena) **3**, 25—71 (1956).
— Histochemische Untersuchungen des Rindenbereiches des Amphibienoocyten. Acta histochem. (Jena) **8**, 458—477 (1959).
—, u. W. Gusek: Elektronenoptische Untersuchungen über die Feinstruktur des Ovarialeies und des Follikelepithels von Amphibien. Exp. Cell Res. **19**, 199—209 (1960).
— — Untersuchungen über die Topochemie und die elektronenoptische Feinstruktur des Ovarialeies von Amphibien. Verh. Anat. Ges., Zürich, 1959. Anat. Anz. Suppl. **106/107** (1960).
—, u. H. E. Stegner: Über die elektronenmikroskopische Feinstruktur des menschlichen Ovarialeies. Z. Zellforsch. **52**, 450—474 (1960).
Wischnitzer, S.: The ultrastructure of the yolk platelets of amphibian oocytes. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 1040—1042 (1957).
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Gestattet das elektronenmikroskopische Bild Aussagen zur Dynamik in der Zelle? Cytologische Studien. VI. Z. Zellforsch. **50**, 1—27 (1959).
— Protistenstudien X. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Amöbe Hyalodiscus simplex n.sp. Protoplasma **52**, 58—107 (1960).

Yamada, E., T. Muta, A. Motomura and H. Koga: The fine structure of the oocyte in the mouse ovary studied with electron microscope. Kurume med. J. **4**, 148—171 (1957).
Yamada, T.: Persönliche Mitteilung.
Yamamoto, K.: Activation of the egg of the dog-salmon by water and the associated phenomena. J. Fac. Sci. Hokkaido **10**, 303—318 (1951).
Yamamoto, T.: The physiology of fertilization in the medaka (Oryzias latipes). Exp. Cell Res. **10**, 387—393 (1956).
Yamamoto, T. S.: Some morphological and physiological aspects of the eggs of Teleostean fishes. J. Fac. Sci. Hokkaido **13**, 484—488 (1957).
— Some experiments on the chemical changes in the membrane of salmon eggs occurring at the time of activation. Jap. J. Ichthyology **6**, 54—58 (1957).

Dr. H. Wartenberg, Anatomisches Institut, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg 20, Martinistraße 52

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z. B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Vor kurzem erschien:

Pathologie und Klinik in Einzeldarstellungen

Herausgegeben von R. HEGGLIN, Zürich · F. LEUTHARDT, Zürich · R. SCHOEN, Göttingen
H. SCHWIEGK, München · H. U. ZOLLINGER, St. Gallen

Neunter Band

Klinische Physiologie und Pathologie des Wasser- und Salzhaushaltes

Mit besonderer Berücksichtigung der Beziehungen
Aldosteron — Ödeme — Diuretica

Von Priv.-Dozent Dr. WALTER SIEGENTHALER,
Oberarzt der Medizinischen Poliklinik der Universität Zürich

Mit einem Geleitwort von Professor R. HEGGLIN, Zürich
Mit 37 Abbildungen. XII, 175 Seiten Gr.-8°. 1961. Ganzleinen DM 49,60

ZUR INFORMATION

Aus der Kenntnis der neuesten Forschungsergebnisse lassen sich grundsätzliche Folgerungen für die Behandlung ödematöser Erkrankungen ableiten. Neben der kausalen Therapie kommt der symptomatischen Beeinflussung der Ödeme vor allem mit den Diuretica eine wesentliche Bedeutung zu. Durch die neuerdings mit den diuretisch wirksamen Aldosteronantagonisten geschaffene Möglichkeit der Beeinflussung der Aldosteronaktivität hat die klinische Aldosteronforschung zudem den Anschluß an die Praxis gefunden.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A G., Würzburg
Printed in Germany